

**Növényvírusok fertőzésében és a növény fejlődésében szerepet játszó  
mikro RNS-ek azonosítása és vizsgálata**

**Doktori (Ph.D.) értekezés**

**Készítette: Válóczy Anna**

**Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont,  
Növény Virologiai Csoport  
Témavezető: Dr. Havelda Zoltán**

**Eötvös Loránd Tudományegyetem  
Természettudományi Kar  
Biológia Doktori Iskola  
Doktori Iskola vezetője: Prof. Erdei Anna DSc., az MTA levelező tagja  
Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Program  
Programvezető: Prof. Orosz László DSc., az MTA levelező tagja**

**Gödöllő  
2009**

## Tartalomjegyzék

<b>Tartalomjegyzék .....</b>	<b>2</b>
<b>Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>4</b>
<b>Bevezetés és célkitűzés .....</b>	<b>6</b>
Célkitűzések .....	7
<b>Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>8</b>
A miRNS-ek .....	8
A miRNS-ek jelentősége .....	8
A miRNS-ek keletkezése .....	8
A miRNS-ek működése .....	12
miRNS családok .....	13
A növényi vírusok .....	14
A Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus jellemzése .....	14
A tarlórépa göndörödés vírus jellemzése .....	15
A poszttranszkripcionális géncsendesítés .....	16
A poszttranszkripcionális géncsendesítés szupressziója .....	17
A miRNS-ek és vírusfertőzés kapcsolata .....	18
<b>Anyagok és módszerek .....</b>	<b>20</b>
Kísérleti anyagok és organizmusok .....	20
Vegyszerek és forgalmazók .....	20
Baktérium törzs .....	20
Plazmid konstrukciók .....	20
Az LNA oligonukleotidok .....	21
Növények .....	22
Molekuláris biológiai módszerek .....	22
In vitro RNS transzkripció .....	22
Tesztnövények fertőzése .....	22
Vírus tisztítás .....	23
Növényi össz-RNS tisztítás .....	23
Northern hibridizáció .....	23
kisRNS northern analízis .....	24
Növényi össz-fehérje tisztítás és Western-blot analízis .....	24
<i>N. benthamiana</i> növények <i>in situ</i> hibridizálása .....	25

<i>A. thaliana</i> növények <i>in situ</i> hibridizálása.....	26
<b>Eredmények és értékelésük .....</b>	<b>28</b>
MiRNS-ek detektálása northern blot analízissel.....	28
Az LNA oligók érzékenysége.....	28
Az LNA oligók specifitása .....	32
Az LNA oligók alkalmazása <i>in situ</i> hibridizálásra .....	35
Az LNA oligók érzékenységének vizsgálata <i>in situ</i> hibridizálás során .....	35
Az LNA oligók specifikusságának vizsgálata <i>in situ</i> hibridizálás során.....	36
Az <i>in situ</i> hibridizáláshoz használt tesztnövények.....	38
Az <i>in situ</i> hibridizáláshoz felhasznált LNA próbák .....	38
A miRNS-ek expressziós mintázatának vizsgálata <i>in situ</i> hibridizációval <i>N. benthamiana</i> és <i>A. thaliana</i> növényekben .....	39
A miR171 akkumulációjának vizsgálata.....	39
A miR156 akkumulációjának vizsgálata .....	41
A miR164 expresszió vizsgálata .....	44
A miR159 és miR319 akkumulációjának vizsgálata .....	45
A miR163 expressziós mintázatának vizsgálata .....	48
A miR165/166 expressziós mintázatának vizsgálata .....	48
Auxin válasz faktorok szabályzásában szerepet játszó miRNS-ek vizsgálata.....	49
A miR160 és célszekvenciájának expressziós mintázata .....	51
A miR168 expresziós mintázatának vizsgálata .....	52
A miRNS-ek időbeli expressziója .....	53
A miRNS-ek térbeli expressziós mintázata .....	53
A vírusfertőzés során szerepet játszó miRNS-ek vizsgálata .....	54
<b>Eredmények összefoglalása.....</b>	<b>59</b>
<b>Publikációs lista .....</b>	<b>61</b>
A dolgozat anyagából megjelent publikációk .....	61
Egyéb publikációk: .....	61
<b>Irodalomjegyzék.....</b>	<b>62</b>
<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>73</b>
<b>Összefoglaló.....</b>	<b>74</b>
<b>Summary .....</b>	<b>75</b>

**Rövidítések jegyzéke**

AGO	-	Argonaute
cDNS	-	komplementer DNS
dpi	-	infiltrálást követő nap
CP	-	köpenyfehérje (coat protein)
CymRSV	-	<i>Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus (Cymbidium ringspot virus)</i>
Cym19stop	-	mutáns vírus, mely nem kódolja a vírus szuppresszor fehérjét
dsRNS	-	kettősszállú RNS
DCL	-	DICER-LIKE
GAPDH	-	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HEN1	-	HUA ENHANCER1
HYL1	-	HYPONASTIC LEAVES1
kb	-	kilobázis
kDa	-	kilodalton
LNA2	-	locked nucleic acid, minden második nukleotidja van LNA monomerre cserélve
LNA v. LNA3	-	locked nucleic acid, minden 3. nukleotidja van LNA monomerre cserélve
MIR	-	miRNS gének
MP	-	a sejtről-sejtre történő mozgásért felelős fehérje (movement protein)
miRNS	-	mikro RNS (micro RNA)
nt	-	nukleotid
ORF	-	nyitott leolvasási keret
PCR	-	polimeráz láncreakció
pre-miRNA	-	miRNS prekursor
pri-miRNA	-	a miRNS gének transzkriptumai
PTGS	-	transzkripció utáni géncsendesítés (posttranscriptional gene silencing)
RdRP	-	RNS-függő RNS-polimeráz enzim
RNáz	-	ribonukleáz
RMV	-	<i>Ribgrass mosaic virus</i>
RISC	-	RNA-induced silencing complex
RT-PCR	-	reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció
SE	-	SERRATE



---

siRNS	-	kis interferáló RNS (small interfering RNA)
sg	-	szubgenomi
ssRNS	-	egyszálú RNS (single strand)
TCV	-	tarlórépa göndörödés vírus ( <i>Turnip crinkle virus</i> )
UTR	-	nem transzlálódó régió (untranslated region)
wt	-	vad típusú (wild type)

## Bevezetés és célkitűzés

A többsejtű eukarióta szervezetek bonyolult, térben és időben szabályozott fejlődési program alapján fejlesztik ki a rájuk jellemző szerveket és szöveteiket. A program lefutását elsősorban a szervezetek genetikai információja szabályozza, de a fejlődés során szükség van a genomban található mobilis genetikai elemek aktivitásának és a külső környezeti tényezők hatásának ellenőrzésére is. Az eddig általánosan vizsgált transzkripciós faktorokon alapuló génszabályozási mechanizmus mellett az utóbbi években fény derült egy új, mikro RNS-eken (micro RNA; miRNA) alapuló szabályozási módra is. Ezek alkotják az eukariótákból leírt nem kódoló kis RNS-ek egyik nagy csoportját. Fontos szerepük van a különböző fejlődésszabályozási folyamatokban, a fehérje-kódoló gének kb. 30%-át szabályozzák. Bioinformatikai adatok alapján a genomban található gének hozzávetőlegesen 1%-a kódol miRNS prekursorokat, mely megközelítőleg a transzkripciós faktorok génjeinek a számával egyezik meg. A miRNS-ek célszekvenciáinak konzerváltsága arra utal, hogy széleskörű szabályozási funkcióval rendelkeznek a sejt növekedésben, sejtosztódásban és a differenciálódásban. Érthető tehát, hogy az első miRNS-ek felfedezése óta egyre nagyobb az érdeklődés a miRNS-ek, célszekvenciáik és ezek expressziója, működési mechanizmusa iránt.

A miRNS-ek a genomban kódolt MIR génekről keletkeznek. A MIR gének transzkriptumai, a miRNS prekursorok (pre-miRNS) jellegzetes hajtűszerű másodlagos szerkezetet mutatnak. A pre-miRNS-ből a DICER-LIKE1 (DCL1) enzimkomplex egy 21-24 bázispár hosszú kettősszalú terméket hasít ki, amelynek az egyik szála (az érett miRNS, amely részleges vagy teljes komplementaritást mutat a cél mRNS-sel) beépül a végrehajtó komplexbe (RNA-induced silencing complex, RISC), meghatározva ezzel a végrehajtó komplex szekvensspecifitását. Ily módon a miRNS-ek közvetlenül és negatívan szabályozhatják a cél mRNS-üket. Ez a szabályozás történhet translációs gátlással, ami inkább az állati rendszerekre jellemző, ill. a miRNS célszekvenciájának hasításával, amely elsősorban a növényekben fordul elő. A cél mRNS-ek hasításáért a RISC fő komponense, az ARGONAUTE (AGO) felelős.

Az RNS csendesítés (más néven poszttranszkripcionális géncsendesítés, PTGS) az eukariótákban az evolúció során a különböző parazita nukleinsavak ellen kialakult védekezési mechanizmus. A PTGS mechanizmusnak az elve megegyezik a miRNS-ek keletkezésével, de ebben az esetben a kiváltója egy transzgen vagy vírus eredetű kettősszalú RNS. A dsRNS-eket elsősorban DCL4 enzimkomplex ismeri fel és 21-24 bázispárnyi RNS-ekre (kis

interferáló RNS, small interfering RNA, siRNA) darabolja fel. A képződött siRNS-ek beépülnek a RISC komplexbe, amely így az siRNS-ekkel homológ szekvenciákat felismeri és azokhoz kapcsolódva, az siRNS által meghatározott szekvencia közepénél elhasítja azokat.

A siRNS és miRNS útvonal legalább egy része átfed, ezért feltételezhető, hogy a miRNS-ek is szerepet játszanak a növények különböző fertőzésekkel szembeni védekezésében.

### Célkitűzések

Munkánk elsődleges célja a miRNS-ek által történő szabályozási folyamatok vizsgálata volt. Ehhez szükség volt a miRNS-ek és célszekvenciáik expressziós mintázatának térbeli vizsgálatára.

Ez idáig a miRNS-ek és a miRNS prekursorok kimutatására northern blot analízist használtak, ahol a poliakrilamid gélen elválasztott mintákat DNS próbával hibridizálták. Ezzel a módszerrel meghatározható a miRNS-ek mérete, és expressziós szintje, viszont nem elég érzékeny, különösen alacsony expressziós szintet mutató miRNS-ek esetében. Ilyen esetben tehát nagy mennyiségű mintára van szükség a northern blot analízishez, ami nem mindig áll rendelkezésre.

1. Kísérleteink során elsőként a fent említett problémát terveztük megoldani egy hatékony miRNS kimutatási rendszer kidolgozásával.
2. Mivel a miRNS-ek szerepének vizsgálatához *in situ* hibridizációs kísérletekre van szükség, így célunk volt egy hatékony *in situ* hibridizációs eljárás kidolgozása miRNS-ek kimutatására *Nicotiana benthamiana* és *Arabidopsis thaliana* növények esetén is.
3. Az általunk kidolgozott miRNS *in situ* hibridizációs rendszert felhasználva terveztük vizsgálni a különböző miRNS térbeli és időbeli expresszióját és létrehozni egy *in situ* miRNS adatbázist.
4. A miRNS-ek és célszekvenciáik expressziós mintázatának összehasonlításával szerettük volna vizsgálni a miRNS-ek által történő szabályozási mechanizmust.
5. Mivel a miRNS és siRNS útvonal részben átfed, ezért terveztük vizsgálni a különböző vírusfertőzések során tapasztalható miRNS-szint változásokat.

## Irodalmi áttekintés

### A miRNS-ek

#### A miRNS-ek jelentősége

Az eukarióta szervezetekben leírt nem kódoló kis RNS-ek egyik nagy csoportját a mikro RNS-ek (micro RNA, miRNA) alkotják. Ezeknek, az eddig általánosan vizsgált transzkripciósfaktorokon alapuló génszabályozási mechanizmus mellett, jelentős szerepük van a különböző szabályozási folyamatokban. Az első miRNS-eket nematódában írták le, ezek a lin-4 (Lee et al., 1993) és a let-7 (Reinhart et al., 2000) voltak, melyek a különböző lárvastádiumok közötti átmenetet szabályozzák. Napjainkban a növényekben, állatokban, ill. vírusokban leírt miRNS-ek száma 4000-re tehető, melyek miRNS adatbázisban hozzáférhetőek (Griffiths-Jones et al., 2006). Egyre nyilvánvalóbbá válik az is, hogy a miRNS-eknek esszenciális szerepük van a különböző fejlődésszabályozási folyamatokban, ezek szabályozzák a fehérje-kódoló gének kb. 30%-át (Lewis et al., 2005). Bioinformatikai adatok alapján a genomban található gének hozzávetőlegesen 1%-a kódoló miRNS prekursorokat, mely szám megközelítőleg megegyezik a transzkripciósfaktorok számával (Lim et al., 2003). Az azonosított miRNS-ek döntő többsége transzkripciósfaktorokat szabályoz. Az eddigi adatok azt mutatják, hogy a növényi miRNS-ek többsége konzervatív, vagyis ugyanaz a miRNS megtalálható különböző növénycsaládokban és a rokon miRNS-ek közt csak kismértékű eltérés mutatható ki. Előfordulnak azonban fajspecifikus miRNS-ek is (Sunkar et al., 2005).

#### A miRNS-ek keletkezése

A miRNS-ek rövid, 21-24 nt hosszú nemkódoló RNS-ek, melyek a miRNS génekről (MIR gének) keletkeznek, általában saját promóterrel rendelkeznek és transzkripciójukat a fehérje kódoló génekhez hasonlóan az RNS polimeráz II végzi (Lee et al., 2004). A MIR gének transzkriptumai (pri-miRNS) kb. 1 kilobázis hosszúságúak, poliadeniláltak, 5' végi „cap”-et tartalmaznak és hajtűszerű másodlagos szerkezetet vesznek fel. Állatokban a pri-miRNS-ekből a Drosha (RNáz III endonukleáz), hasításával a sejtmagban pre-miRNS-ek (prekursor) keletkeznek (Kurihara and Watanabe, 2004; Park et al., 2005). Ezek a pre-miRNS-ek clusterekbe rendeződve találhatóak a pri-miRNS-eken és közös promóterról íródnak át (Bartel,

2004). A Drosha aszimmetrikusan és specifikusan hasítja a hajtú struktúra mindkét szálát. Az így keletkezett 60-70 nt hosszúságú pre-miRNS az Exportin-5 (Exp5) segítségével kijut a sejtmagból a citoplazmába (Han et al., 2004; Lund et al., 2004), ahol a Dicer (DCR, RNáz III endonukleáz) enzimkomplex rövid, kettősszálú miRNS:miRNS\* duplexet hasít ki, 5' foszfát és 3' 2nt túlnyúló véget hagyva. Növényekben a pri-miRNS-ek és a pre-miRNS-ek hasítását egyaránt a DICER-LIKE1 (DCL1) enzimkomplex végzi a sejtmagban (Park et al., 2005).

A növényi pre-miRNS-ek az állati prekursorokkal szemben egyesével keletkeznek és általában jóval hosszabbak (60-300 nt), mint az állati pre-miRNS-ek (Bartel and Bartel, 2003; Bartel, 2004) (1. ábra). *Arabidopsis thaliana*-ban négy DCL enzimet kódoló gén található, melyek közül a miRNS képződésben alapvetően a DCL1 vesz részt (Xie et al., 2004). A DCL1 szerepét az ún. *carpel factory* (*caf*, (Jacobsen et al., 1999)), *abnormal suspensor1* (*sus1*, (Schwartz, 1994)) és *short integument1* (*sin1*, (Robinson-Beers et al., 1992)) mutánsokon írták le. Ezek a mutások a csökkent miRNS akkumuláció következtében számos fejlődési rendellenességet mutatnak, úgy, mint módosult levélforma, hímsterilitás, a virágmerisztéma rendellenes fejlődése, késői virágzás, rendellenes magkezdemény és embriófejlődés (Park et al., 2002). A DCL1 egyedül is képes a pri-miRNS-ek és a pre-miRNS-ek hasítására, de pontos működéséhez mindkét esetben szükség van HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) és SERRATE (SE) fehérjékre is (Dong et al., 2008; Laubinger et al., 2008; Yang et al., 2006b). A HYL1 egy dsRNS kötő fehérje, amely a DCL1 komplexszel kölcsönhatva a pre-miRNS-ek pontos hasításáért felelős (Han et al., 2004; Vazquez et al., 2004). A *hyl1* mutáns növények fenotípusa átfed a DCL1 mutánsokéval, ezek alacsony növésű, rendellenes levelekkel rendelkező, csökkent fertilitású növények. A SE fehérje HYL1-hez kapcsolódva szintén a hasítás hatékonyságát és pontosságát növeli. Míg a HYL1 kétszeresére, a SE hatszorosára növeli a DCL1 hasítás hatékonyságát, a HYL1 és SE együtt több mint 7-szeresére (Dong et al., 2008). Mind a DCL1, mind a SE null mutánsok letálisak. A gyenge *se-1* mutánsok rendellenes levélállással és levelekkel fejlődnek. Legújabb eredmények szerint a hasításhoz szükség van még egy cap binding komplexre (CBC) is, mely feltételezhetően a SE fehérjéhez kapcsolódva segíti a hasítást (Laubinger et al., 2008; Montgomery and Carrington, 2008).

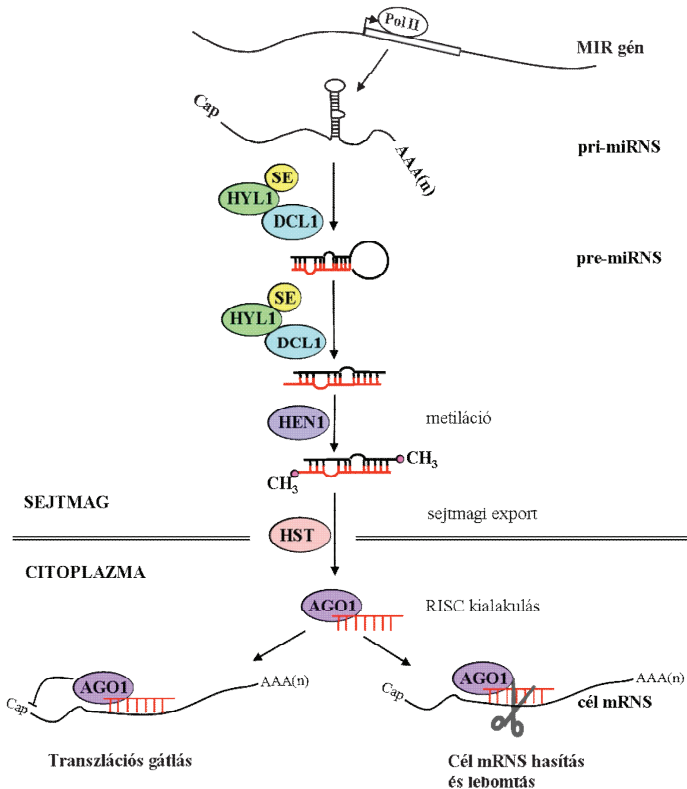
A kiasadt miRNS-t a HUA ENHANCER1 (HEN1) metilálja. A HEN1 egy S-adenosyl methionine (SAM)–függő metiltranszferáz, mely szintén rendelkezik dsRNS kötő doménnel és sejtmagi lokalizációs szignált tartalmaz. A HEN1 a miRNS/miRNS\* duplex mindkét szálán a 3' végén lévő ribóz 2' hidroxil csoportját metilálja (Yang et al., 2006c; Yu et al., 2005), ennek hiányában a miRNS-ek uridilálódnak (Li et al., 2005). A metiláció védi a

miRNS-eket a kis RNS-eket lebontó SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE1-től (SDN1), mely egy 3'-5' exonukleáz. A *hen1* mutáns növények a DCL1 mutánsokhoz hasonlóan alacsonyabb növéssűiek, csökkent fertilitásúak, rendellenes levéllel és virággal fejlődnek (Chen et al., 2002). Az *sdn1* mutáns növényekben a miRNS-ek mennyisége megnő és ezzel párhuzamosan különböző fejlődési rendellenességeik jelentkeznek, mint pl. kicsi, fogazott vagy torzult levelek (Ramachandran and Chen, 2008). Ezek a rendellenességek arra utalnak, hogy a miRNS-ek keletkezése mellett a lebomlásuk is elengedhetetlen a fejlődési folyamatok a megfelelő működéséhez.

A növények miRNS-einek citoplazmába történő transzportjában feltételezhetően az Exp5 ortológ HASTY (HST) játszik szerepet, bár HST hiányában sem figyelhető meg miRNS felhalmozódás a sejtmagban (Park et al., 2005). HST hiányában a növények rendellenesen fejlődő virágzattal és csúcsi merisztémával rendelkeznek (Park et al., 2005).

A citoplazmába jutott miRNS/miRNS\* duplex miRNS szála növények és állatok esetében is beépül az RNS csendesítés végrehajtó komplexébe (RNA-induced silencing complex, RISC), míg a miRNS\* szál lebomlik. Az, hogy melyik szál épül majd be a komplexbe és melyik bomlik el a miRNS/miRNS\* duplex termodinamikája határozza meg. Ezek alapján a RISC-be az a szál épül, melynek az 5' vége a duplex kevésbé stabil felére esik (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003).

A RISC fő komponense az Argonaute (AGO), mely a cél mRNS-ek hasításáért felelős (Baumberger and Baulcombe, 2005). Az AGO egy 90-100-kD-os, ún. PAZ PIWI DOMAINS (PPD) fehérje (Carmell et al., 2002). A PAZ domén nevét a fehérjecsoport 3 fő tagjáról (*Drosophila* P ELEMENT-INDUCED WIMPY TESTIS (PIWI), *Arabidopsis* ARGONAUTE1 (AGO1) és *Arabidopsis* ZWILLE (ZLL)) kapta. Ez az AGO fehérjén kívül a DICER-ben is megtalálható, PIWI doménnel azonban a DICER nem rendelkezik. (Cerutti et al., 2000). A PPD fehérjék közül sok rendelkezik RNáz-H aktivitással, mely az egyszálú RNS (ssRNS) molekulát hasítja a kisRNS-sel komplementer régióban. A funkcionális különbség kihangsúlyozására a PPD fehérjéket, a kettősszálú RNS-eket hasító DICER fehérjével szemben, SLICER-nek nevezték el.



### 1.ábra A miRNS-ek képződésének és működésének folyamata növényekben

A Pol II által átírt kb. 1 kb hosszú pri-miRNA transzkriptumot a DCL1 hasítja pre-miRNS-ekre, majd tovább miRNA/miRNA\* duplex-re. A DCL1 működését a HYL1, SE és feltehetően még más fehérjék is segítik. A miRNA/miRNA\* duplex-et a HEN1 metilálja, majd a HST segítségével a citoplazmába jut. A duplex egyik szála, az érett miRNS az AGO1-et tartalmazó RISC-be épül, míg a másik szál (miRNA\*) elbomlik. A beépült miRNS határozza meg a RISC szekvenszspecifitását. Növényekben az aktív RISC elsősorban a célszekvensziák hasításával kisebb részű transzlációs gátlással szabályoz. Az elhasított mRNS oligouridinálódik, majd nukleázok lebontják.

Az AGO változó N-terminális és konzervált C-terminális PAZ, MID (middle, középső) és PIWI doménekből áll. A MID domén a kisRNS-ek 5' foszfátját, míg a PAZ domén a 3' véget köti (Song et al., 2004). A PIWI domén az RNáz-H enzimekre jellemző térszerkezetet vesz fel, és endonukleáz aktivitással rendelkezik (Song et al., 2004; Vaucheret, 2008).

*A. thaliana*-ban 10 AGO gént írtak le, melyek más-más funkcióval bírnak. Ezek közül a miRNS útvonalon AGO1-nek van a legfontosabb szerepe. (Vaucheret, 2008). A különböző *ago1* mutánsok rendellenes merisztémával és aszimmetrikus levelekkel fejlődnek, mely fenotípus a *phb/phv* (*phabulosa/phavoluta*) mutánsokéhoz hasonlít (Yang et al., 2006a). Ezekben a növényekben a mutáns fenotípussal arányosan csökken a miRNS szint és növekedett a cél mRNS szint, vagyis az AGO1 szükséges a megfelelő miRNS szint fenntartásához. Az AGO1 elsősorban azokat a kisRNS-eket köti, melyek 5' végükön uridint tartalmaznak, és amivel a miRNS-ek többsége is rendelkezik (Mi et al., 2008).

### A miRNS-ek működése

A miRNS-ek két fő módon szabályozhatják célgénjük kifejeződését: az mRNS-ek hasításával vagy translációs gátlásával. A végrehajó enzimkomplex szekvensspecifitását mindkét esetben a RISC-be beépült miRNS-ek határozzák meg.

Növényekben a miRNS-ek általában teljes vagy majdnem teljes komplementaritást mutatnak a cél mRNS-sel, mely a célszekvencia hasítását indukálja (Tang et al., 2003). A miRNS felismerő hely általában az mRNS kódoló szakaszán található (Rhoades et al., 2002). Mutációs vizsgálatokkal kimutatták, hogy a miRNS felismerő hely középső és 5' régiója felelős a biológiai aktivitásért, a 3' vég jelentősége kisebb (Parizotto et al., 2004). A hasítás után az 5' hasítási termék 3' vége oligo-uridinálódik, amely a molekula gyors lebomlását eredményezi (Shen and Goodman, 2004). A 3' hasítási termék ezzel szemben lassabban bomlik le, amely lebontást az EXORIBONUCLEASE4 (XRN4) végzi 5'-3' irányban (Souret et al., 2004).

Állatokban a növényektől eltérően több, részleges komplementaritást mutató miRNS felismerő hely található az mRNS 3' nem translálódó régiójában (untranslated region, UTR) (Bartel, 2004). A célszekvencia felismeréséhez elengedhetetlen a miRNS 5' végén a 2-től 7 vagy 8. nukleotidig terjedő, ún. „seed region” teljes komplementaritása (Brennecke et al., 2005; Lewis et al., 2005). Kiterjedt komplementaritás hiányában a miRNS-sel töltött RISC a 3' UTR-hez kötődik, ami a cél mRNS által kódolt fehérje translációjának gátlását eredményezi (Carrington and Ambros, 2003; Du and Zamore, 2005). A transláció gátlásának mértékét a 3' UTR-ben található miRNS felismerő helyek száma szabja meg (Brennecke et al., 2003).



Bár állapotokban a transláció gátlás a meghatározó mechanizmus, számos miRNS szabályozza célszekvenciáját hasítással (Du and Zamore, 2005). Hasonlóan, növényekben is találtak példát translációs gátlással történő szabályozásra. *A. thaliana*-ban a miR172 által szabályozott APETALA2 a célszekvencia hasítása mellett translációs gátlással is szabályozódik (Aukerman and Sakai, 2003). Az állati rendszerektől eltérően azonban itt a miRNS és célszekvenciája teljes komplementaritást mutat és a célszekvencia a kódoló régióban található (Brodersen et al., 2008).

### miRNS családok

Mind az állati, mind a növényi genomban több prekurzorról keletkezik hasonló miRNS, vagyis a miRNS-ek is géncsaládokat alkotnak. Az állati miRNS-ek sok, kicsi miRNS családba sorolhatók, míg a növényekben kevesebb a miRNS családok száma, viszont ezek a miRNS családok nagyobbak. Így pl. az egérben található 340 miRNS 251 családba tartozik, míg az *A. thaliana*-ban lévő 118 miRNS-t 47 családba sorolták (Griffiths-Jones et al., 2006). A különböző prekurzorokról keletkező, de egymáshoz nagyon hasonló miRNS-eket a miRNS számát követő kisbetűvel jelölik (pl. miR171a). Az állati miRNS génektől eltérően, ahol még az érett miRNS szekvenciájában is lehet eltérés, az egy családba tartozó növényi miRNS-ek nagyon hasonlóak, és ez a hasonlóság nem csak az érett miRNS-re, hanem az egész miRNS génre kiterjed (Liu et al., 2007).

Az érett miRNS-ek egy része konzervált a rokon fajok közt, eltérő azonban az egyes fajokban a miRNS kópiák száma.

A miRNS-ek származásáról egyelőre keveset tudunk, de feltételezhetően a célszekvenciákról keletkeztek (Allen et al., 2004), majd ezekkel együtt fejlődtek. A miRNS-ek a fehérje-kódoló génekhez hasonló duplikációs események során sokszorozódhattak (Maher et al., 2006), mely az érett miRNS szekvenciákon kívül eltéréseket okozhat. Ez lehetőséget ad arra, hogy a különböző prekurzorokról keletkező, de azonos miRNS-ek térben és időben eltérően expresszálódjanak, ill. hogy eltérő funkciót lássanak el.

## A növényi vírusok

Napjainkban a leírt növényvírusok száma meghaladja az 500-at (Hull, 2002). Élő szervezetbe jutásuk passzív folyamat. Az általuk okozott tünetek széles skálája ismert az alig észrevehetőtől a növény teljes nekrozisáig (Matthews, 1991).

A növényi vírusok többnyire nukleinsavból és az azt körülvevő fehérjeburokból állnak. Genomjuk RNS vagy DNS, mindkettő lehet egy- vagy kettősszálú. Az eddig megismert növényvírusok több mint 90%-a egyszálú RNS vírus. Ezek 77%-ának RNS-e pozitív orientációjú, vagyis e vírusok genomja a fertőzés során mRNS-ként képes viselkedni. A vírusok a fertőzött sejtekben a gazdanövény fehérjeszintetizáló rendszerét és erőforrásait használják fel replikációs ciklusuk lebonyolításához (Buck, 1996). A keletkezett utódvírusok először a szomszédos sejtekbe jutnak át sejtről-sejtre való mozgással, majd az edénynyalábok közvetítésével a növény távolabbi részeibe szállítódnak (Tzfira et al., 2000).

Mivel a vírus RNS-en több gén található, a vírusok génkifejeződése 5 különböző stratégia szerint vagy azok kombinációjával történhet: szubgenomikus RNS-eken keresztül, osztott virális genommal, poliproteinien keresztül, átolvasható (leaky) stop kodonnal vagy olvasási keret váltással (Maia et al., 1996). Egyes vírusok 5' végén elhelyezkedhet a gazdasejt mRNS-eihez hasonlóan 7-metilguanozin sapka, míg más vírusok 5' végéhez kovalensen kötött fehérje kapcsolódhat. A vírusok 3' végükön tartalmazhatnak poli-(A) véget vagy RNS-szerű struktúrákat, de a 3' régióban minden vírusnak tartalmaznia kell a vírus RdRP felismerő helyét, amely promóterként szolgál a komplementer szál szintéziséhez.

A pozitív szálú RNS vírusok által kódolt egyik legáltalánosabb fehérje a köpenyfehérje (CP). A köpenyfehérje elsődleges funkciója a vírusrészecske külső burkának létrehozása, mely védi a vírus RNS-t a sejtben lévő nukleáz hatásoktól, sok esetben azonban szerepet játszik a vírus növényben történő mozgásában is. Minden eddig leírt, replikációképes vírus kódol a replikációjáért felelős egy vagy több fehérjét, ezeket nevezik RNS-függő RNS-polimeráznak (RdRP). Sok vírussal sikerült azonosítani a vírus sejtről-sejtre és szállítónyalábokban való terjedésében szerepet játszó fehérjét (movement protein, MP) is.

### A Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus jellemzése

Kutatócsoportunk által az egyik leggyakrabban használt vírus a tombusvírusok családjába tartozó Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus (*Cymbidium ringspot virus*, CymRSV) (Russo et

al., 1994). A tombusvírusok 30nm átmérőjű, ikozahedrális alakú virionnal rendelkeznek, melyek nagyon stabilak és a fertőzött növényben igen magas koncentrációt érnek el. Az ide tartozó vírusok jól terjednek földdel és mechanikai úton.

A CymRSV pozitív egyszálú RNS vírus, melynek genomja egy kb. 4700 nukleotid hosszú egyoszlatú molekula (Dalmay et al., 1993). A vírus RNS 5' végéhez nem kötődik fehérje és 3' végén nincs poli-(A) vég, de a 3' végén egy jellegzetes RNS másodlagos struktúra található (Havelda and Burgyan, 1995).

A vírus genomja öt nyitott leolvasási keretet (open reading frame, ORF) tartalmaz (Dalmay et al., 1993) (2. ábra). A 33kDa-os ORF 1 és 95 kDa-os ORF 2 együtt kódolják a replikációért felelős fehérjét, és a sikeres vírus replikációhoz mindkettőre szükség van. A genomikus RNS-en kívül két szubgenomikus (sg) RNS van jelen. Ezek a genomikus RNS-ről keletkeznek, átíródásukat a szubgenomikus promóterek irányítják. A szubgenomikus RNS 1-ről (sg 1) íródik át az ORF 3, amely a 41 kDa méretű köpenyfehérjét kódolja. A sgRNS 2 két fehérjét kódol, az ORF 4 által kódolt 22 kDa-os fehérjét, amely a sejtről-sejtre történő mozgásért felelős (movement protein, MP) (Scholthof et al., 1995) és az ORF 5-öt által kódolt 19 kDa-os fehérjét (p19). A p19 fontos szerepet játszik a vírus által okozott nekrotikus tünetek kialakulásában (Burgyan et al., 2000) és a poszttranszkripcionális géncsendesítés gátlásában (Szittyta et al., 2002), (Voinnet et al., 1999).

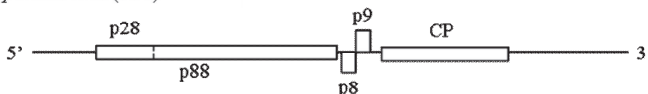
### A tarlórépa göndörödés vírus jellemzése

A tarlórépa göndörödés vírus (*Turnip crinkle virus*, TCV) szintén a tombusvírusok családjába tartozik. Pozitív egyszálú RNS vírus, melynek 4053 nt hosszú genomja 5 fehérjét

*Cymbidium ringspot virus* (CymRSV)



*Turnip crinkle virus* (TCV)



2.ábra A CymRSV és a TCV genomfelépítése

kódol (Carrington et al., 1989) (2. ábra). Gazdanövényeinek széles körébe tartozik az *A. thaliana* is. Genomja 5 ORF-et kódol, melyek közül az első kettő (p28 és p88) a vírus replikációjáért felelős fehérjék. A két középső ORF (p8 és p9) az első szubgenomikus RNS-ről keletkezik és a vírus mozgásért felelős fehérjéit kódolja. A második szubgenomikus RNS a köpenyfehérjét (CP) kódolja. Bár a köpenyfehérje elsődleges feladata a vírus burkának kialakítása, a TCV köpenyfehérjeje szerepet játszik a vírus mozgásában (Hacker et al., 1992), a tünetek kialakításában, ill. a poszttranszkripcionális géncsendesítés gátlásában is (Qu et al., 2003).

### **A poszttranszkripcionális géncsendesítés**

Az RNS csendesítés egy ősi eukarióta mechanizmus, amelyet a parazita nukleinsavak (viroidok, vírusok és transzpozonok) ellen alakítottak ki a különböző élőlények az evolúció során. A mechanizmus elnevezése a különböző élőlényekben más és más: növényeknél poszttranszkripcionális géncsendesítés (PTGS), állatoknál RNS interferencia (RNAi), gombák esetében pedig „gene quelling”. (Carrington et al., 2001) (Vance and Vaucheret, 2001).

A PTGS molekuláris mechanizmusának elve megegyezik a miRNS-ek keletkezésével, de ebben az esetben a kiváltója egy kettősszálú (double strand; ds) RNS, amely lehet transzgén vagy vírus eredetű. A transzgénnek beépülhetnek a genomba fordított ismétlődésként (inverted repeat), így ezek transzkripciója során komplementer RNS-ek keletkeznek, melyek közvetlenül indukálják a PTGS-t. Előfordulhat az is, hogy a transzgénnek transzkripciója során „aberráns” RNS-ek képződnek. Ezek az „aberráns” RNS-ek templátként szolgálhatnak egy növényi RdRP-nek, mely egy második szálát szintetizál hozzájuk (Waterhouse et al., 2001).

A legtöbb növényi vírus egyszálú RNS (single strand, ssRNA) genommal rendelkezik. A vírusok a növényi sejtbe jutva, saját RdRP-jük segítségével replikálódni kezdenek. A replikáció során kettősszálú replikációs RNS intermedier molekulák keletkeznek. Ezek a dsRNS molekulák hatékonyan indukálják a növény PTGS-en alapuló védekező rendszerét (Molnar et al., 2005).

A virális dsRNS-eket elsősorban a DCL4 enzimkomplex ismeri fel és darabolja 21-24 bázispárnys RNS-ekre (kis interferáló RNS, small interfering RNA, siRNA). A siRNS-eknek két csoportját sikerült megkülönböztetni méretük alapján: rövidebb, 21-22 nt és hosszabb, 24-26 nt siRNS-eket (Hamilton et al., 2002). A képződött siRNS-ek beépülnek a RISC

komplexbe, amely így az siRNS-ekkel homológ szekvenciákat felismeri és azokhoz kapcsolódva, az siRNS által meghatározott szekvencia közepénél elhasítja azokat.

Magasabb rendű növényekben a sejt szintű PTGS-en kívül létezik egy az egész növényre kiterjedő szisztemikus PTGS is (Palauqui et al., 1997; Voinnet and Baulcombe, 1997). A sejtben indukált PTGS során képződött rövidebb, 21nt hosszú siRNS-ek szignál molekulaként viselkedve feltehetően képesek sejtről-sejtre és a növény szállítószövet rendszerét kihasználva hosszú távon is terjedni (Himber et al., 2003), aktiválva így a PTGS-t a vírus által még nem fertőzött sejtekben is. Amikor a vírus ezekbe a sejtekbe lép, a már aktív PTGS azonnal le tudja bontani a vírus RNS-t (Baulcombe, 2002; Havelda et al., 2005).

### A poszttranszkripcionális géncsendesítés szuppressziója

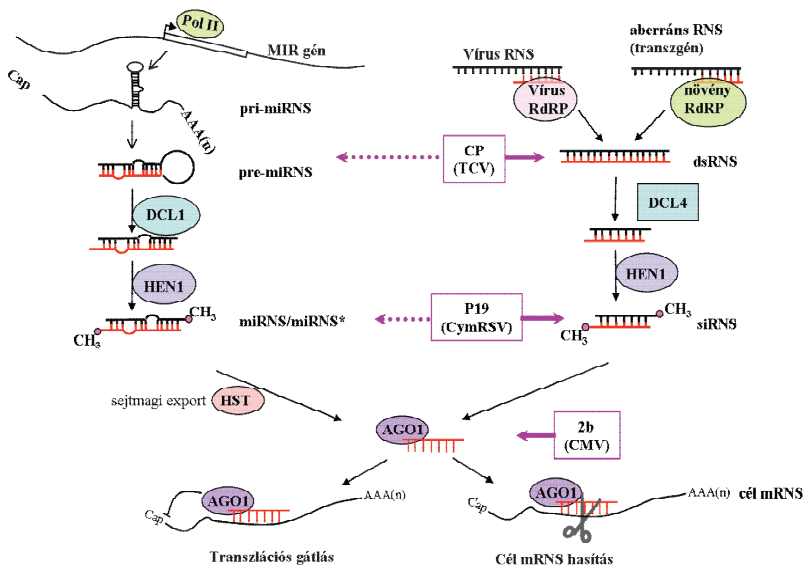
A különböző növényi vírusok a koevolúció során a hatékony fertőzés érdekében olyan fehérjéket fejlesztettek ki, melyek különböző módokon gátolni képesek a PTGS működését (Kasschau and Carrington, 1998; Voinnet et al., 2000).

A Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus szupresszor fehérjéje a p19 (Szittyá et al., 2002). Ez a fehérje gátolja a transzgén által indukált helyi és szisztemikus PTGS-t. Vírusfertőzés esetén a p19 nincs hatással a sejt szintű PTGS-re, a szisztemikus PTGS kialakulását viszont megakadályozza. A p19-et nem kódoló CymRSV fertőzés esetén a növény a fertőzésből kigyógyul, ún. „recovery” fenotípust mutat. A homodimert formáló p19 szekvenciájuktól függetlenül, méretük alapján köti a PTGS során keletkező ds siRNS-eket (Silhavy et al., 2002). A fertőzött sejtekben a p19 megköti a vírus specifikus siRNS-ek döntő többségét, megakadályozva így a RISC komplex programozását (Lakatos et al., 2004).

A tarlórépa göndörödés vírus köpenyfehérjéje (TCV CP) a géncsendesítés kezdeti lépését, a DCL4 hasítását gátolja, megakadályozva így a helyi és a szisztemikus PTGS kialakulását is (Qu et al., 2003) (Merai et al., 2006).

### A miRNS-ek és vírusfertőzés kapcsolata

A siRNS és miRNS útvonal legalább egy része átfed (Kasschau et al., 2003), ezért feltételezhető, hogy a miRNS-ek is szerepet játszanak a növények különböző fertőzésekkel szembeni védekezésében. A miR393-at túltermelő növények például ellenállóbbak lettek a baktériumos fertőzésekkel szemben (Navarro et al., 2006). Vírusfertőzés hatására a miRNS útvonalban bekövetkező változásokról jelenleg kevés adat áll rendelkezésünkre.



#### 3. ábra. A miRNS képződésének és a PTGS mechanizmusának folyamata

A Pol II által átirított kb. 1 kb hosszú pri-miRNA transzkriptumot a DCL1 hasítja pre-miRNS-ekre, majd tovább miRNA/miRNA\* duplex-re. A miRNA/miRNA\* duplex-et a HEN1 metilálja, majd a HST segítségével jut a citoplazmába. A duplex egyik szála, az érett miRNS az AGO1-et tartalmazó RISC-be épül, míg a másik szál (miRNA\* szál) elbomlik. A beépült miRNS határozza meg a RISC szekvenspecifitását. Növényekben az aktív RISC elsősorban a célszekvenciák hasításával kisebb részüket transzlációs gátlással szabályoz.

A PTGS kiváltója egy kettősszállú (double strand; ds) RNS, amely lehet transzgén vagy vírus eredetű. A dsRNS-eket elsősorban a DCL4 enzimkomplex ismeri fel és darabolja 21-24 bázispárnyi RNS-ekre. A képződött siRNS-ek beépülnek a RISC komplexbe, amely így a siRNS-ekkel homológ szekvenciákat elhasítja.

A különböző vírusok által kódolt PTGS szupresszor fehérjék különböző módokon képesek gátolni a PTGS-t.

Immunoprecipitációs vizsgálatok azt mutatták, hogy az AGO1 a miRNS-eken kívül különböző siRNS-eket is köt, melyek egyaránt lehetnek transzgén vagy vírus eredetűek (Baumberger and Baulcombe, 2005). Az *ago1* mutáns növények fogékonyabbak lettek az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) fertőzésre (Morel et al., 2002). Ennek a vírusnak a szupresszor fehérjéje, a 2b az AGO1 hasítását gátolja (Zhang et al., 2006).

Különböző vírusok PTGS szupresszorait termelő transzgenikus növények számos fejlődési rendellenességben szenvednek (Chapman et al., 2004). Ezekben a növényekben a vizsgált miRNS célszekvenciák mennyisége megnövekedett, viszont ezzel párhuzamosan nem csökkent az őket szabályozó miRNS-ek szintje. A tombusvirusok p19 fehérjéje, a *Beet yellow virus* p21 fehérjéje és a potyvirusok P1/HC-Pro fehérjéje a kisRNS duplexet köti, gátolva így a RISC komplex kialakulását (Lakatos et al., 2006; Lakatos et al., 2004). A TCV CP elsősorban a siRNS keletkezésben szerepet játszó DCL2-t gátolja, és nem a miRNS útvonalon lévő DCL1-et, mégis hatással van a miRNS útvonalra (Chapman et al., 2004).

## Anyagok és módszerek

A kísérletek nagy részét az általános RNS és DNS kezelési technikák alapján végeztük (Sambrook, 1989). Az említett kézikönyvben nem szereplő vagy módosított eljárásokat közöljük az Anyagok és Módszerek fejezetben.

### Kísérleti anyagok és organizmusok

#### Vegyszerek és forgalmazók

A kísérletek során használt vegyszereket különböző kereskedelmi forrásokból szereztük be, mint Sigma, Roche, Roth, Reanal, Fluka, Serva és Merck.

A restrikciós endonukleázokat és a modifikációs enzimeket a Promega, Fermentas, New England Biolabs, Amersham cégektől rendeltük. A különböző ribo- és dezoxi-ribonukleotidokat a Promega-tól, míg a radioaktívan jelzett nukleotidokat az IZINTA Kft-től rendeltük meg. Az autoradiogramok készítéséhez Fuji röntgenfilmeket használtunk.

#### Baktérium törzs

Kísérleteink során az *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  törzsét használtuk (supE44 $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80LacZ $\Delta$ M15) hsdR17 RecA1 gyrA96 thi-1 relA1).

#### Plazmid konstrukciók

Klónozáshoz és *in vitro* transzkriptum előállításához a pUC 18 (New England Biolabs), a pBluescriptII SK (Stratagene) és a pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI USA) plazmid vektorokat használtuk.

A G11-es plazmid a CymRSV RNS (Dalmay et al., 1993) teljes hosszúságú cDNS szekvenciáját tartalmazza a T7-es fág DNS-függő RNS-polimeráz promóter szekvenciája után. A klónok 3' vége CCC-re végződik, így *Sma*I restrikciós enzim segítségével (CCCGGG) pontosan a vírusszekvencia 3' végén linearizáltuk a plazmidokat. Ezt követően a klónokról T7 RNS-polimeráz segítségével, biológiaiilag aktív *in vitro* RNS transzkriptumot ill. antisense próbát készítettünk (lásd később).



A GAPDH és az Ago1 konstrukciók elkészítéséhez *N. benthamiana* RNS kivonatból RT-PCR segítségével cDNS-t szintetizáltunk. A cDNS-t GAPDHNb-s (5'-TCTCAAATATGACTCCACCC-3') és GAPDHNb-as (5'-ACCCCATTCATTGTCATACC-3'), illetve Ago1Nb-s (5'-GTCATCTTGCCAGACAATAATGG-3) és Ago1Nb-as (5'-CAGATCCTGAATAAGCTCTTGCC-3') primerekkel amplifikáltuk, majd az agaróz gélen tisztított fragmentumokat pGEM-T Easy Vector-ba (Promega, Madison, WI USA) klónoztuk a gyártó utasításai szerint. Az így kapott GAPDH klónt *Apal* ill. *SpeI* enzimekkel linearizáltuk, majd SP6 ill. T7 RNS-polimeráz segítségével sense és antisense próbák készítésére használtuk fel. Az ARF16 konstrukciót ez előzőekhez hasonlóan készítettük el, a cDNS-t ARF16 5'-s (5'-TCTCCCTATTCCTCCCATGG-3') és ARF16 5'-as (5'-CGGGTCCATTACCTATCCCT-3') primerekkel amplifikáltuk, majd pBluescriptII SK (Stratagene) plazmidba klónoztuk és *EcoRI* ill. *BamHI* enzimekkel történő linearizálás után T3 ill. T7 RNS polimerázzal készítettül el az antisense és sense próbákat.

A miR171 konstrukcióhoz DNS oligonukleotidot terveztünk, mely a miR171a szekvenciát tartalmazta háromszor tandem ismétlődés formában sense és antisense orientációban. A két oligót anellálás után pBluescript II KS vektorba ligáltuk. PvuII ill. BglI enzimmel végzett linearizálás után T7 ill. T3 RNS-polimeráz segítségével sense és antisense próbákat készítettünk.

### Az LNA oligonukleotidok

miR156\_LNA oligonukleotid az *A. thaliana* miR156a: 5'-GTGCTCACTCTCTTCTGTCA-3'  
 miR159\_LNA az *A. thaliana* miR159a: 5'-TAGAGCTCCCTTCAATCCAAA-3';  
 miR160\_LNA az *A. thaliana* miR160: 5'-TGGCATACAGGGAGCCAGGCA-3';  
 miR161\_LNA3 az *A. thaliana* miR160: 5'-CCCGATGTAGTCACTTTCAA;  
 miR163\_LNA az *A. thaliana* miR163: 5'-ATCGAAGTTCCAAGTCTCTTCAA-3',  
 miR164\_LNA az *A. thaliana* miR164a: 5'-TGCACGTGCCCTGCTTCTCCA-3';  
 miR166\_LNA az *A. thaliana* miR166a: 5'-GGGGAATGAAGCCTGGTCCGA-3';  
 miR167\_LNA az *A. thaliana* miR167a: 5'-TAGATCATCGTGGCAGCTTCA-3';  
 miR168\_LNA az *A. thaliana* miR168a: 5'-TTCCCGACCTGCACCAAGCGA-3';  
 miR171\_LNA az *A. thaliana* miR171a: 5'-GATATTGGCGCGGCTCAATCA-3';  
 miR319\_LNA az *A. thaliana* miR319a: 5'-GGGAGCTCCCTTCAGTCCAA-3';  
 miR122a\_LNA3 a *Mus musculus* miR122: 5'-ACAAACACCATTGTCACACTCCA-3';  
 miR124\_LNA a *Mus musculus* miR124a: 5'-TGGCATTACCGCGTGCCTTAA-3';  
 miR128\_LNA3 a *Mus musculus* miR128: 5'-AAAAGAGACCGCTTCACTGTGA-3';  
 miR449\_LNA a *Gallus gallus* miR449: 5'-ACCAGCTAACATACACTGCCA-3';  
 TCV\_LNA3 a TCV: 5'-GAACTTCCGGACTCCGACTCTAGGATC-3' detektálására.  
 A mismatch oligókat az 1. táblázat tartalmazza.

## Növények

Kísérleteinkhez fitotronban nevelt *Arabidopsis thaliana* növények Columbia ökotípusát és üvegházi körülmények között nevelt *Nicotiana benthamiana* növényeket használtunk fel.

A *N. benthamiana* növényeket a fertőzés kezdetétől fitotronban neveltük (22°C nappali és 18°C éjszakai hőmérséklet, 16/8 óra nappal-éjszaka periódus, 75% relatív páratartalom).

Az *A. thaliana* növényeket növénynevelő kamrában 21°C-on 8 óra megvilágítás mellett neveltük, majd szintén 21°C-on 16/8 óra nappal-éjszaka periódusú körülmények mellett virágoztattuk.

## **Molekuláris biológiai módszerek**

### In vitro RNS transzkripció

A tisztított plazmid DNS-eket a megfelelő restrikciós endonuklázzal hasítottuk, majd a linearizált DNS-t fenol-kloroformmal extraháltuk, etanollal kicsaptuk, majd centrifugálás és szárítás után steril desztillált vízben feloldottuk. A szokásos 100 µl-es transzkripció reakcióelegy tartalmazott 2-3 µg linearizált templátot, 500 mM ATP-t, CTP-t, UTP-t és GTP-t, 100 unit RNAsint (Promega), 10 mM dithiothreitol, 6 mM magnézium-kloridot, 4mM spermidint, 40 mM Tris-HCl-t (pH 7.2) és 100 unit T7, T3 ill. SP6 RNS-polimerázt (Promega). A reakcióelegyet 1-2 órán át inkubáltuk 37°C-on, majd 1,2 %-os agaróz gélen elválasztottuk, és ethidium-bromiddal megfestve ellenőriztük a transzkriptumok minőségét.

### Tesztnövények fertőzése

A fertőzések során a gazdavírus *in vitro* RNS transzkriptumának elegyét 1:1 arányban hígítottuk inokuláló pufferral (Heaton et al., 1989). *N. benthamiana* tesztnövények leveleit (3 levél növényenként) inokuláltuk 15-15 µl fertőző eleggyel, üvegspatula segítségével.

### Vírustisztítás

A vírust *N. benthamiana* növényeken szaporítottuk fel. A vírust, a jellegzetes tüneteket mutató növényekből 14 nappal az inokuláció után tisztítottuk (Gallitelli, 1985), mind az inokulált, mind a szisztemikus levelekből. A tüneteket mutató leveleket pH 5,5; 1% aszkorbinsavat tartalmazó, 50 mM-os Na-acetát pufferben homogenizáltuk. Ezt követően 1 órára jégre helyeztük, majd alacsony fordulatszámon centrifugáltuk. A felülúszóhoz 10% PEG 6000-et és 200 mM NaCl-t adtunk és a vírust egy ciklus differenciál centrifugálással elválasztottuk. A vírust tartalmazó csapadékot pH 5,5-ös, 50 mM-os Na-acetát pufferben oldottuk vissza.

### Növényi össz-RNS tisztítás

Az RNS extraktumot növénylevelekből a korábban leírt módszer alapján vontuk ki (White and Kaper, 1989), néhány módosítással. 100-200 mg levélszövetet homogenizáltunk, jégbehűtött dörzscsészében, 600 µl RNS kivonó pufferben (100 mM glicin, pH 9,0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA) feltártuk és ugyanannyi fenollal összeértük. A vizes fázist fenol-kloroformmal, majd ezt követően kloroformmal extraháltuk, etanollal kicsaptuk, és 50 µl steril desztillált vízben feloldottuk.

### Northern hibridizáció

A növényi össz-RNS izolálását követően mintánként 20 µg RNS-t denaturáltunk a felvivő pufferben (1X MOPS, 50% formamid, 7% formaldehid, 0.1 µg/µl etidium-bromid), majd az RNS mintákat formaldehides, 1,2%-os agaróz gélben, MAE pufferben (0,1M MOPS [pH 7,0], 40mM Na-acetát, 5mM EDTA) választottuk el. Elektroforézis után a gélből az RNS-t Hybond-N nylon membránra (Amersham) blottoltuk. A membránt Sigma PerfectHyb pufferében előhibridizáltuk, majd hibridizáltuk egy éjszakán át a gyártó leírása szerint. A hibridizációhoz próbaként a linearizált AGO klónt a Fermentas cég HexaLabel<sup>TM</sup> jelölő kitjét felhasználva, random primer meghosszabbításával jelöltük [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP jelenlétében. Ezt követően a filtert csökkenő sókoncentráció mellett mostuk (2x SSC, 0,1% SDS – kétszer 10 perc, 42°C; 0,5x SSC, 0,1% SDS – kétszer 10 perc, 42°C; 0,1x SSC, 0,1% SDS – kétszer 10 perc, 42°C) (1x SSC: 0.15 M NaCl, 15 mM Na<sub>3</sub>-citrát, pH=7.2), majd előhívtuk.

### kisRNS northern analízis

A totál nukleinsav kivonatokat 12%-os denaturáló poliakrilamid gélen választottuk el. Elektroforézis és az urea kimosása után Hybond-N nylon membránra (Amersham) blottoltuk, majd UV fénnyel keresztkötöttük (Amersham crosslinker). A membránt kisRNS pufferben (50% formamid, 5xSSPE [1xSSPE: 0,115M NaCl, 10mM nátrium-foszfát és 1mM EDTA, pH 7,4], 5xDenhardt's oldat [1xDenhardt's: 0,02% Ficoll, 0,02% poli-vinil-pirrolidon és 0,02% BSA], 0,5% SDS és kompetitor DNS [Hering sperma DNS, Sigma, 0,02 mg/ml]) előhibridizáltuk, majd hibridizáltuk. Próbaként [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dATP-vel végjelöltünk 1-10 pmol LNA ill. DNS oligonukleotidot T4 polinukleotid kináz segítségével. Ezt követően a filtert csökkenő sókoncentráció mellett (2x SSC [1x SSC: 0.15 M NaCl, 15 mM Na<sub>3</sub>-citrát, pH=7.2], 0,1% SDS – kétszer 10 perc, 0,5x SSC, 0,1% SDS – kétszer 10 perc a hibridizálási hőmérsékleten), majd az esetek egy részében exponálás után erősen (0,1x SSC, 0,1% SDS – kétszer 5 perc, 65°C) mostuk és ismét exponáltuk.

A próbák ellenőrzésére végzett spot teszt (5. F ábra) 10 ill. 1  $\mu$ g DNS oligonukleotidot cseppentettünk fel Hybond-N nylon (Amersham) membránra, mely oligonukleotidok a vizsgált LNA próbákkal tökéletesen komplementerek voltak. A DNS oligonukleotidokat UV fénnyel keresztkötöttük (Amersham crosslinker), majd a fent leírt módszerrel hibridizáltuk.

### Növényi össz-fehérje tisztítás és Western-blot analízis

A növényi mintákat 1x Laemmli pufferben (60mM Tris/HCl pH 6,8; 2% SDS; 12% Glicerol, 100mM DTT; bromfénol kék), proteáz inhibitor (Sigma, Protease Inhibitor Cocktail for plant cell and tissue extracts) jelenlétében dörzsmozsárban homogenizáltuk. 10 perc forralás után a mintákból a sejttörmeléket centrifugálással távolítottuk el (13000 rpm, 10 perc). A mintákat ezután 10%-os akrilamid gélen választottuk el, majd az elválasztott fehérjéket Bio-Rad elektroblot készülékkel (300mA, 4 h) blottoltuk PVDF (polivinil-difluorid) membránra (Amersham). A filtereket blokkoló pufferben (5% tejpor, 50mM Tris/HCl pH 7,4; 150mM NaCl, 0,05% Tween-20) inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 órát. Ezt követően a filtert poliklonális anti-AGO elsődleges ellenanyag (*N. benthamiana* AGO1-1 kimutatására tervezett ellenanyag, EUROGENTEC) jelenlétében (1:500 arányban hígítva) TBST pufferben (50mM Tris/HCl pH 7,4; 150mM NaCl, 0,05% Tween-20, 1mg/ml BSA) szobahőmérsékleten inkubáltuk 2 órán át. Ezután a filtert peroxidázhoz kapcsolt (1:2500

arányban hígított) másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk (ECL Rabbit IgG, HRP-Linked, Amersham) szintén TBST pufferben, szobahőmérsékleten 1 órán át, majd a kemilumineszcens jelet ECL kittel (Amersham), röntgenfilm segítségével tettük láthatóvá.

#### *N. benthamiana* növények *in situ* hibridizálása

A hibridizálás során a korábban leírt módszert követtük (Jackson, 1992 ), kisebb módosításokkal.

##### *Beágyazás*

A *N. benthamiana* növények *in situ* hibridizálásához a szöveteket 4%-os formaldehydiben PBS pufferben (0,13 M NaCl, 7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), jégen vákuuminfiltráltuk és egy éjszakán keresztül fixáltuk. A fixált szöveteket ezután 4°C-on 50, 70, 85, 95, 100%-os etanol oldatsor segítségével dehidratáltuk, majd festés után (Eosine Y, Fluka) az alkoholt szobahőmérsékleten fokozatosan Roti<sup>®</sup>-Histol (Roth) oldatra cseréltük. A mintákhoz ezután fokozatosan paraffin (Paraplast embedding media, Sigma) darabkákat adagoltunk telítésig szobahőmérsékleten, majd 42°C-on. Ezt követően 58°C-ra melegített paraffint öntöttünk a mintákra, melyet még 4-5 napig cseréltünk. Orientálás után a lehűtött mintákból 10 µm-es metszeteket készítettünk, melyeket poly-L-lysine kezelt tárgylemezre (Poly-prep Slides, Sigma) helyeztünk.

##### *Próbakészítés*

Az LNA oligonukleotidokat DIG oligonucleotide 3'-End Labelling Kit (Roche) segítségével jelöltük a gyártó utasításai szerint. A jelölt próbákat tisztítás nélkül kétszeres térfogatra hígítottuk deionizált formamiddal, majd ebből használtunk tárgylemezenként 1-3 µl-t a hibridizáláshoz. A linearizált klónokról T7, T3 ill. SP6 polimerázzal digoxigenin-11-UTP (Boehringer Mannheim) jelenlétében sense és antisense RNS próbákat készítettünk. A transzkriptumokat DNÁzzal kezeltük, majd karbonát pufferben (2 x karbonát puffer: 80 mM NaHCO<sub>3</sub>, 120 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) törtük 60°C-on 0.15 – 0.2 kb hosszúra. A próbákat ezután kicsaptuk, majd 50% formamidban oldottuk vissza és tárgylemezenként 50–200 ng próbát használtunk fel.

### *Hibridizálás*

A paraffin eltávolítását és fokozatos hidratálást követően a metszeteket Pronázsal (Sigma) és ecetsav anhidriddel kezeltük, majd ismét dehidratáltuk. A 80°C-on denaturált próbát az 50°C-ra előmelegített hibridizációs mixhez (1x salt (0,3 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl pH=6,8, 0,01 M NaPO<sub>4</sub> puffer pH=6,8, 5mM EDTA), 50% deionizált formamid, 12,5% dextrán sulfát (Fluka), 1 mg/ml tRNS (Sigma), 10X denhardt's oldat [50x oldat: 1% ficoll 400, 1% polivinilpirrolidon, 1% BSA V. Frakció]) kevertük, majd az előmelegített tárgylemezre tettük és 50°C-on egy éjszakán át hibridizáltuk.

A hibridizálást követően a metszeteket 1x SSC (0,3M NaCl, 0,03M Na<sub>2</sub>Citrát), 50% formamid oldatban 50°C-on mostuk. A mosási lépések közt RNáz A-val kezeltük a mintákat a háttér csökkentésére, majd anti-Digoxigenin Fab-fragments (Roche) jelenlétében (1:2000 arányban hígítva) inkubáltuk 90 percet. A jeleket 0,5 mM NBT és BCIP segítségével tettük láthatóvá. A színreakciót a jelek erősségétől függően állítottuk le, majd etanolos mosást követően a szöveteket Alcian Blue-val (Fluka) ellenfestettük. A tárgylemezeket DPX (Fluka) felhasználásával fedtük le.

### *A. thaliana* növények *in situ* hibridizálása

A hibridizálás során a Laux és Mutsaers által módosított módszert követtük (Mayer et al., 1998).

A beágyazás és hibridizálás során használt oldatokat és desztillált vizet DEPC (diethyl-pirokarbonát) kezeléssel RNáz mentesítettük.

#### *Beágyazás*

Az *A. thaliana* növények *in situ* hibridizálásához a szöveteket 4%-os formaldehidben PBS pufferben (0,13 M NaCl, 7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) jégén vákuuminfiltráltuk és szövettípustól függően 4-12 órát 4°C-on fixáltuk. (4 óra - csiránövények, 6-8 óra - virágzat és 8 - 12 óra termés esetén.) A fixált szöveteket ezután 4°C-on 30, 40, 50, 70, 85, 95, 100%-os etanol oldatsor segítségével dehidratáltuk, majd festés után (Eosine Y, Fluka) az alkoholt szobahőmérsékleten fokozatosan Roti<sup>®</sup>-Histol (Roth) oldatra cseréltük. A mintákhoz ezután 42°C-on fokozatosan paraffin (Paraplast embedding media, Sigma) darabkákat adagoltunk telítésig, majd 58°C-ra melegített paraffint öntöttünk a mintákra, melyet még 4-5 napig cseréltünk. Orientálás után a lehűtött mintákból 8 µm-es metszeteket készítettünk, melyeket poly-L-lysine kezelt tárgylemezre (Poly-prep Slides, Sigma) helyeztünk.

### Próbakészítés

A próbakészítés megegyezik a *N. benthamiana*-nál leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy az *A. thaliana* szövetek hibridizálására felhasznált LNA oligonukleotidok 5' végükön gyárilag jelölve voltak digoxigeninnel, majd ezeket az oligókat DIG oligonucleotide 3'-End Labelling Kit (Roche) segítségével jelöltük a gyártó utasításai szerint.

### Hibridizálás

A metszetek előkezelése és a hibridizálás megegyezik a *N. benthamiana*-nál leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy míg a *N. benthamiana* szöveteknél 200 µl hibridizációs mixet használtunk fel tárgylemezenként, *A. thaliana* esetében csak 80 µl-t.

A hibridizálást követően a metszeteket 0,2x SSC-ben (1x SSC: 0,3M NaCl, 0.03M Na<sub>2</sub>Citrát) 50°C-on mostuk. A mosási lépések közt RNáz A-val kezeltük a mintákat a háttér csökkentésére, majd anti-Digoxigenin Fab-fragments (Roche) jelenlétében (1:1250 arányban hígítva) inkubáltuk 2 órát. A jeleket 0,5 mM NBT és BCIP segítségével tettük láthatóvá. A színreakciót a jelek erősségétől függően állítottuk le. A tárgylemezeket ellenfestés nélkül, 50%-os glicerinnel fedtük le.

## Eredmények és értékelésük

### MiRNS-ek detektálása northern blot analízissel

#### Az LNA oligók érzékenysége

Korábban a miRNS-ek kimutatása kis méretüknél fogva nehézséget okozott, ezért célkitűzéseink közül az első egy hatékony miRNS detektálási rendszer kidolgozása volt. Ehhez a korábban általánosan használt DNS oligonukleotidok helyett ún. „locked nucleic acid” (LNA)-módosított oligonukleotid próbákat használtunk fel. Az LNA-k biciklusos nagy affinitású RNS analógok, amelyekben a cukor-foszfat gerinc furanóz gyűrűje kémiaiilag az N-konformációba (3' - endo) kötött egy 2' - 4' metilén hid által. Ezen oligók nagy hőstabilitást mutatnak mind DNS-sel, mind RNS-sel történő hibridizálás esetén (Frieden et al., 2003; Kurreck et al., 2002). Így DNS-hez történő hibridizálás esetén 1-8, RNS-hez történő hibridizálás esetén 2-10°C-kal emelhető az olvadási pont ( $T_m$ ) minden beépített LNA monomerrel. LNA-DNS és LNA-RNS duplexek NMR spektroszkópiás és röntgen kristallográfiás kísérletei azt mutatták, hogy az LNA szerkezete az RNS-hez hasonló, A-típusú Watson-Crick duplex geometriát mutat (Bondensgaard et al., 2000; Petersen et al., 2000). Továbbá az LNA oligokkal végzett kísérletek megnövekedett érzékenységet és specifikitást mutattak microarray kísérletekben (Tolstrup et al., 2003).

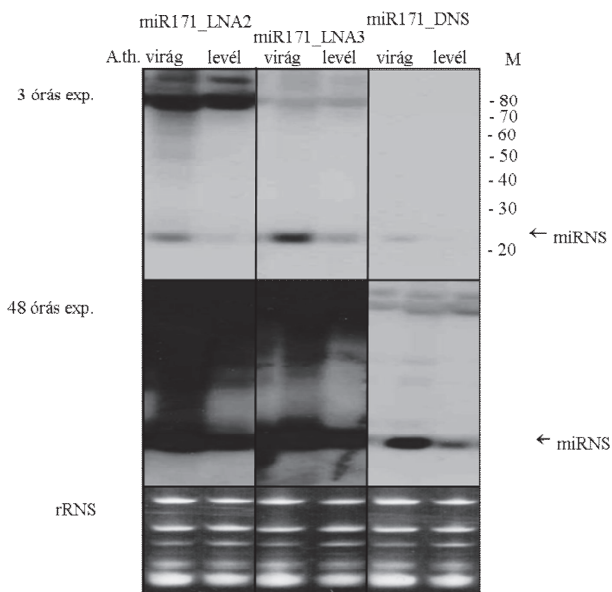
Próba neve	a próba szekvenciája (5'-3')	$T_m$ (°C)	miRNA szekvenciája (5'-3')
miR171DNA	gatattggcgcggctcaatca	66	ugauugagccgcgccaauauc
miR171_LNA2	gAtAtTgGcGcGgCtCaAtCa	83	ugauugagccgcgccaauauc
miR171_LNA3	gAtaTtgGcgCggCtcAatCa	78	ugauugagccgcgccaauauc
miR171_LNA3/2MM	gAtaTtgGcgAggCtcAatCa	ND	ugauugagccgcgccaauauc
miR171_LNA3/MM11	gAtaTtgGcgAggCtcAatCa	ND	ugauugagccgcgccaauauc
miR171_LNA3/MM8	gAtaTtgAgCggCtcAatCa	ND	ugauugagccgcgccaauauc
miR171_LNA3/MM14	gAtaTtgGcgCggAtcAatCa	ND	ugauugagccgcgccaauauc
miR122a_LNA3	acAaaCacCatTgtCacActCca	78	uggagugugacaauggguguuugu
miR124_LNA3	tgGcaTtcAccGcgTgcCttAa	80	uuuaggcacgcggugaagucca
miR128_LNA3	aaAagAgaCcgGttCacTgtGa	77	ucacagugaaccggucucuuuuu
miR161_LNA3	cCccGatGtaGtcActTtcAa	73	uugaagugacuacacugcggg
miR167_LNA3	tAgaTcaTgcTggCagCttCa	79	ugaagcugccagcaugaucua
miR319_DNA	gggagctcccttcagtcctcaa	66	uuggacugaaggagcuccc
miR319_LNA3	ggGagCtcCctTcaGtcCaa	78	uuggacugaaggagcuccc
TCV_LNA3	gAacTtcCggActCtaGgaTc	74	gauccuagaguccggauguuc

#### 1.táblázat A különböző miRNS-ek kimutatására tervezett LNA és DNS oligók

Az LNA nukleotidot-nagybetű, RNS-t és DNS-t kisbetű jelzi, mismatch pirossal jelzett



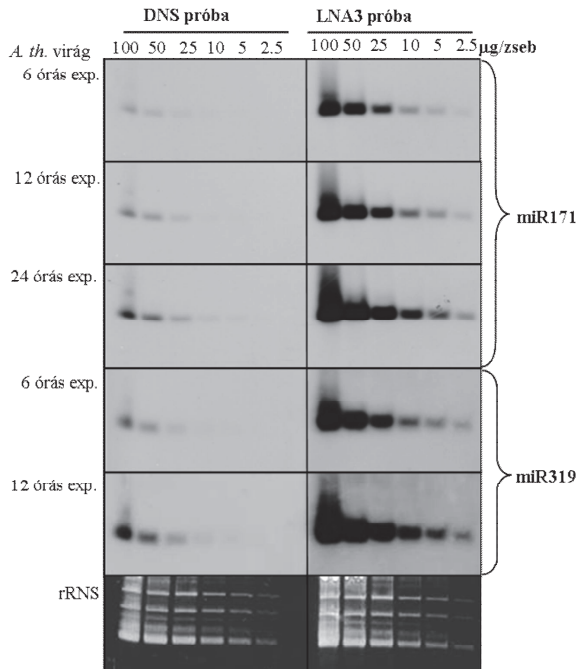
Hogy kihasználjuk az LNA oligók kedvező tulajdonságait, különböző növényi és állati miRNS-ek kimutatására terveztünk olyan LNA módosított oligókat, melyek eltérő mintázattal tartalmaztak módosított nukleotidokat (1. táblázat). Elsőként az *A. thaliana* miR171 kimutatására terveztünk olyan módosított oligonukleotidot, melyekben minden második, ill. minden harmadik nukleotid volt LNA monomerre cserélve. KisRNS northern blot segítségével vizsgálva az oligonukleotidokat, az LNA oligókkal jelentősen megnövekedett a jelintenzitás az érett miRNS-ek mérettartományában (4. ábra). Az LNA és a DNS oligó is mutat hibridizációs jelet magasabb mérettartományban, amely méret azonban nem egyezik meg a pre-miRNS 123 nt-os méretével, tehát feltételezhető, hogy nem specifikus jel.



**4. ábra** LNA2 és LNA3 oligonukleotid próbák összehasonlítása a DNS próbákkal kisRNS northern blot segítségével

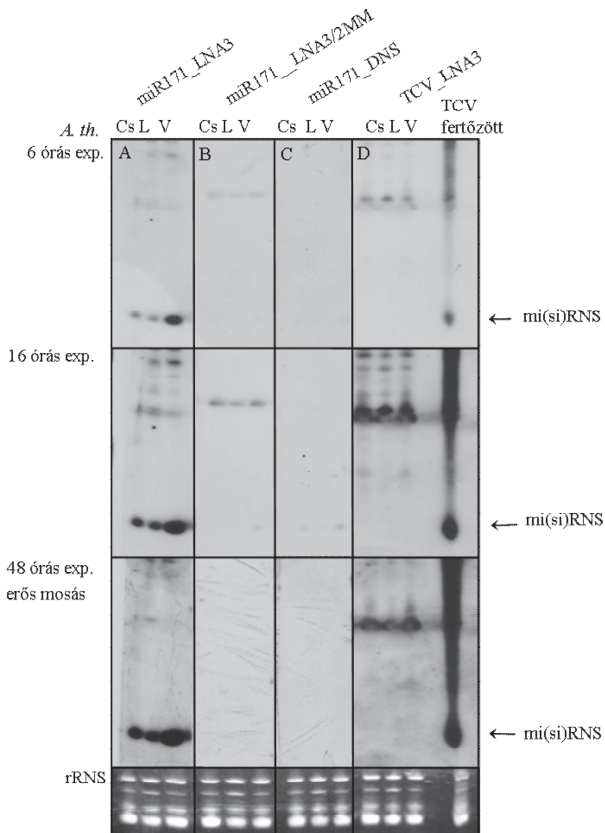
*A. thaliana* virág és levél totál RNS kivonatok (40 µg/zseb) 12% denaturáló poliakrilamid gélen elválasztva 32P-jelölt miR171\_LNA2, miR171\_LNA3 and miR171\_DNA próbákkal hibridizálva 37°C-on. Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként a rRNS látható. M-molekula tömeg marker

Ez a háttér a miR171\_LNA2 próbával volt különösen erős, mely a LNA módosítások magas fokának (50%) és az ebből adódó extrém magas LNA-RNS duplex stabilitásnak köszönhető. Ezzel szemben a miR171\_LNA3 próba érzékenysége jelentősen megnövekedett a DNS próbához képest, viszont ez esetben a háttér gyenge volt. A miR171\_LNA3 próbával hibridizált minták esetében 3 órás expozícióval kapott jelekhez hasonlíthatóan erős jeleket DNS próba esetén csak 48 órás expozíció esetén kaptunk. Ez esetben az LNA oligókkal erősen túlexponált autoradiogramot kaptunk. Hasonló eredmény mutattak az *A. thaliana* miR159 kimutatására alkalmas DNS ill. LNA2 és LNA3 próbák is.



**5. ábra** Az LNA3 módosított próbák összehasonlítása DNS próbákkal kisRNS northern blot segítségével. *A. thaliana* virág mintákon, miR171 és miR319 kimutatásával. 100-2.5 40 μg/zseb totál RNS kivonatok elválasztva 12%-os denaturáló akrilamid gélen és hibridizálva 34°C-on. Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként a rRNS látható.

Az irodalmi adatoknak megfelelően az LNA2 próbák olvadási pontja magasabb volt, mint az LNA3 próbáké. Az LNA2 próbák esetében az erős háttér miatt a hibridizálási és mosási körülmények további optimalizálására lenne szükség. Az LNA3 próbák ezzel szemben a hagyományos módszerrel felhasználhatóak, ezért a további kísérletekhez ezeket az oligókat használtuk.



**6. ábra** Az LNA oligók specifitásának vizsgálata kisRNS northern blot segítségével.

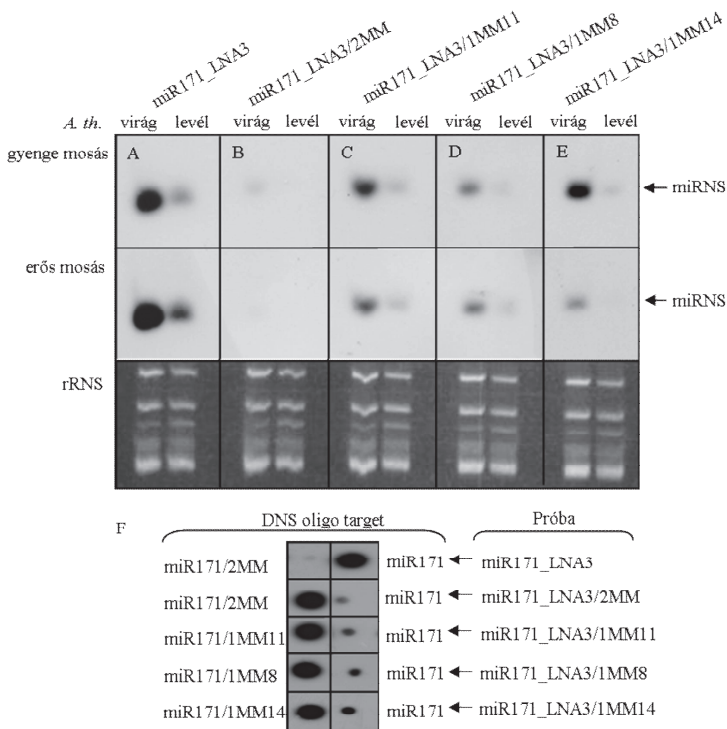
*A. thaliana* csiránövény (Cs), virág (V), levél (L) és TCV (*Turnip crinkle virus*) fertőzött levél 20 µg/zseb totál RNS kivonat hibridizálva miR171\_LNA3 (A), miR171\_LNA3/2MM (B), miR171\_DNA (C) és TCV\_LNA3 (D) oligonukleotid próbákkal. 42°C-on. Az erős mosás 0.1-SSC, 0.1% SDS-t tartalmazó oldatban 65°C-on kétszer 5 perc. Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként a rRNS látható.

Az LNA3 oligonukleotidok érzékenységét további northern blottok segítségével vizsgáltuk. Ehhez különböző mennyiségű *A. thaliana* virág RNS-t választottunk el 100 µg-tól 2,5 µg-ig zsebenként, ezeket hibridizáltuk a miR171-re, ill. a miR319-re tervezett LNA3 és DNS próbákkal (5. ábra). Az előző eredményekhez hasonlóan az érett miRNS-ek kimutathatósága jelentősen megnövekedett az LNA oligókkal, már 2,5 µg mintából is kimutatható volt a miRNS. Így átlagosan 10-szeresére növekedett a hibridizálás érzékenysége a hasonló körülmények között hibridizált DNS oligókhoz képest.

#### Az LNA oligók specifikítása

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy ezek az oligók mennyire képesek egymáshoz nagyon hasonló, pl. azonos miRNS családba tartozó miRNS-ek elkülönítésére. Ehhez először a mosási és hibridizálási körülmények szigorításával próbálkoztunk. Hasonlóan a korábbi eredményeinkhez a miR171\_LNA3 oligóval ebben az esetben is erős jeleket kaptunk, míg a DNS próbával és egy olyan próbával, mely a miRNS szekvencia közepén 2 nt mismatch-et (a célszekvenciához nem illeszkedő nukleotid) tartalmazott (miR171\_LNA3/2MM) alig volt kimutatható miRNS (6. A-C ábra). Kontrollként használtunk egy, a tarlórépa göndörödés vírus (*Turnip crinckle virus*, TCV) kimutatására tervezett LNA oligót (TCV\_LNA3), mellyel jól kimutatható volt a vírus eredetű siRNS, viszont a vírussal nem fertőzött mintákban nem volt nem specifikus jel (6. D ábra).

Az LNA oligók specifikusságának részletesebb vizsgálatára 3 további oligót terveztünk (miR171\_LNA3/MM11, miR171\_LNA3/MM8, miR171\_LNA3/MM14), melyek különböző helyeken tartalmaztak egy-egy nt mismatch-et (1. táblázat). Ezekkel az oligókkal hibridizálva *A. thaliana* virág és levél kivonatokat kisRNS northern blot segítségével, a kapott jelek intenzitása jelentősen csökkent a tökéletesen komplementer miR171\_LNA3 oligóval hibridizált mintákhoz képest (7. ábra). Ez a különbség erősebb mosás hatására tovább növekedett.

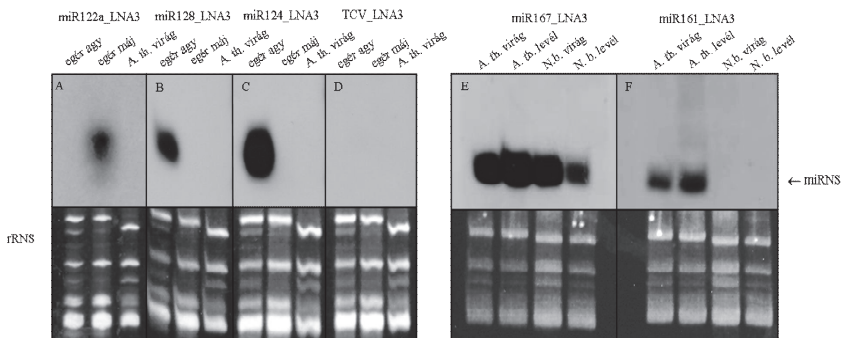


**7. ábra** Az LNA oligók specifikusságának vizsgálata mismatch oligonukleotid próbák felhasználásával kisRNS northern blot segítségével.

20 µg/zseb *A. thaliana* virág, levél totál RNS kivonatok hibridizálva miR171\_LNA3 (A), miR171\_LNA3/2MM (B), miR171\_LNA3/MM11 (C), miR171\_LNA3/MM8 (D) és miR171\_LNA3/MM14 (E) oligonukleotid próbákkal 42°C-on. Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként a rRNS látható. (F) Különböző mismatch-et tartalmazó LNA oligonukleotid próbák hibridizálása a hozzájuk teljesen komplementer és a vad típusú miR171-nek megfelelő DNS oligókhoz.

Annak megállapítására, hogy a kapott jelintenzitásbeli különbségek valóban a próbák érzékenységéből adódnak, hibridizáltuk őket a velük teljesen komplementer DNS oligókhoz (7. F ábra). A mismatcheket tartalmazó LNA3 próbák mindegyike erős jelet adott a velük komplementer DNS oligókhoz hibridizálva, gyenge volt azonban a jel minden más esetben. A növényi kivonatok hibridizálásakor kapott jelintenzitásbeli különbségek tehát az LNA3 próbák érzékenységéből adódtak.

Megvizsgáltuk azt is, hogy mennyire használhatók általánosan az LNA oligók. Egér agyból, májból, *A. thaliana* és *N. benthamiana* virágból és levélből kivont totál RNS kivonatot választottunk el, melyeket különböző miRNS-ekre tervezett próbákkal hibridizáltunk (1. táblázat). Erős hibridizációs jeleket kaptunk az egér agy specifikus miR124\_LNA3 és miR128\_LNA3 próbákkal az egér agy mintákban, nem volt viszont háttér az egér máj, ill. *A. thaliana* virág RNS kivonatok esetén (8. B-C ábra). Hasonlóan csak az egér máj mintáknál kaptunk jelet a máj specifikus miR122a\_LNA3 oligóval (8. A ábra). A negatív kontrollként használt vírus specifikus TCV\_LNA3 próba ebben az esetben sem adott hátteret. A miR167 mind *A. thaliana*, mind *N. benthamiana* mintákból kimutatható volt (8. E ábra), míg a miR161 csak *A. thaliana*-ban volt jelen (8. F ábra)



**8. ábra** Az LNA oligók specifikusságának vizsgálata egér *A. thaliana* és *N. benthamiana* specifikus miRNS-ek kimutatására tervezett LNA oligók felhasználásával kisRNS northern blot segítségével.

(A–D) 20 µg/zseb egér agy, máj és *A. thaliana* virág totál RNS kivonat hibridizálása 45°C-on miR122a\_LNA3 (A), miR128\_LNA3 (B), miR124\_LNA3 (C) és negatív kontrollként TCV\_LNA3 (D) próbák felhasználásával. (E–F) 20 µg/zseb *N. benthamiana* és *A. thaliana* virág és levél totál RNS kivonatok hibridizálása 45°C-on miR167\_LNA3 (E) és miR161\_LNA3 (F) próbák felhasználásával. Az ábrák alsó részén mennyiségi kontrollként a rRNS látható.

Az LNA oligók tehát szigorú hibridizálási és mosási körülmények között is megfelelően működtek, lehetővé téve akár csak 1 mismatch kimutatását is, vagyis az egy miRNS családba tartozó miRNS-ek elkülönítését. Az, hogy az LNA3 (továbbiakban LNA) próbákkal kapott jelek specifikusak és jelintenzitás a DNS próbákkal kapott jeleknek kb 10-szerese, lehetőséget adott arra, hogy ezeket *in situ* hibridizációs kísérletekben is alkalmazzuk.

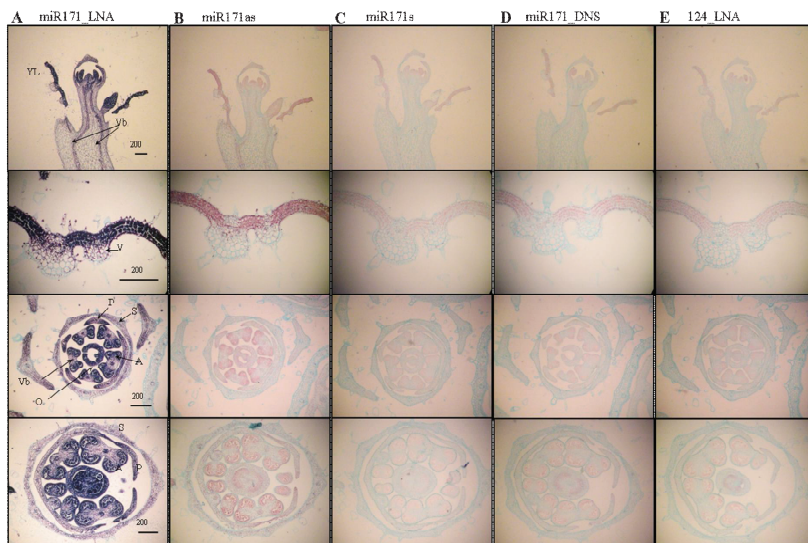
### Az LNA oligók alkalmazása *in situ* hibridizálásra

A növényi miRNS-ek közül számos szabályoz olyan géneket, melyek különböző fejlődési folyamatokban - mint pl. a merisztéma kialakulása és a sejtosztódás - játszanak szerepet (Kidner and Martienssen, 2005). A miRNS útvonalak megzavarása általában fejlődési rendellenességekkel jár (Achard et al., 2004; Laufs et al., 2004; Mallory et al., 2005; Palatnik et al., 2003). Így például a térben jól szabályozottan kifejeződő miR165/166, mely a *PHAVOLUTA* és *PHABULOSA* géneket szabályozza, fontos szerepet játszik a levél morfológia kialakításában (Juarez et al., 2004; Kidner and Martienssen, 2004). *In situ* hibridizációs kísérletek azt mutatták, hogy a miR165/166 és célszekvenciáik egymást kiegészítő térbeli expressziós mintázatot mutatnak, amely alapján feltételezhető, hogy a miRNS-ek a cél mRNS-ek teljes eltávolításán keresztül fejtik ki hatásukat (Emery et al., 2003; Williams et al., 2005).

A miR166 jelenléte az edénynyalábokban arra utal, hogy a miRNS szignál molekulaként viselkedhet (Juarez et al., 2004). Szintén erre utal különböző miRNS-ek jelenléte is a *Cucurbita maxima* floémmedvében (Yoo et al., 2004). Ezzel szemben transzsgénikus kísérletek azt mutatták, hogy a miR171 transzkripciójának és aktivitásának mintázata egybeesik, ami valószínűsíti, hogy ebben az esetben a miRNS-ek a keletkezésük helyén hatnak (Parizotto et al., 2004). Az ellentmondásos irodalmi adatok alapján nyilvánvaló, hogy a miRNS-ek működési mechanizmusának jobb megismeréséhez szükséges expressziójuk térbeli vizsgálata. A miRNS-ek térbeli expressziójának *in situ* hibridizációs vizsgálatára az LNA oligókkal végzett northern blot analízis kísérletek érzékenysége és specifikussága adott lehetőséget.

### Az LNA oligók érzékenységének vizsgálata *in situ* hibridizálás során

Elsőként összehasonlítottuk az LNA oligókat az általánosan *in situ* hibridizáláshoz használt RNS próbákkal. Elkészítettünk a miR171-nek egy tandem ismétlődést tartalmazó DNS klónját, melyről *in vitro* RNS-t tudunk szintetizálni. Erről digoxigeninnel jelölt sense (miR171s) és antisense (miR171as) RNS próbákat készítettünk. Ezeket, ill. 3' végükön digoxigeninnel jelölt miR171\_LNA és miR171\_DNS oligonukleotidokat használtuk fel *N. benthamiana* csucs (9. ábra első sor), levél (9. ábra második sor) és virág (9. ábra 3-4. sor) szövetek *in situ* hibridizálására. A mintákat paraffinba ágyaztuk, majd 10 µm-es egymást



**9. ábra** Az LNA oligonukleotid és az RNS próbák összehasonlítása miRNS kimutatására *in situ* hibridizációval.

*N. benthamiana* fejlődő virágzati csúcs hosszszelvénye (első sor), fiatal levél keresztmetszete (második sor), fiatal virág keresztmetszetei (3. és 4. sor) miR171\_LNA próbával (A), sense és antisense digoxigenin jelölt RNS próbákkal (B és C), DNS oligonukleotid próbával és negatív kontrollként az egér miR124\_LNA oligonukleotid próbával hibridizálva.

Vb – szállítószövet (vascular bundle); YL – fiatal levél (young leaf); O – magház (ovary); S – csésze (calyx, sepals); P – szirm (corolla, petals); A – porzó (anther); V – ér (vein).

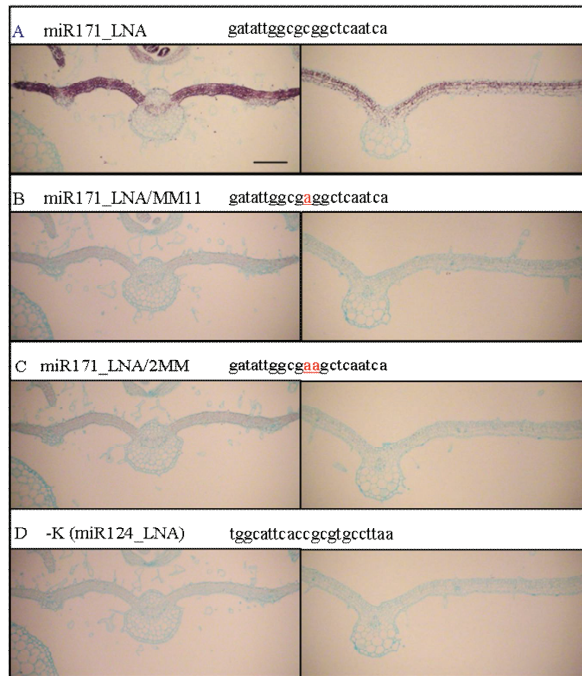
A sáv (A ábrán) 200 μm-t jelöl

követő metszeteket készítettünk. Bár a miR171\_LNA (9. A ábra) és a miR171as (RNS) (9. B ábra) próbával hasonló expressziós mintázatot figyeltünk meg minden szövettípus estében, az LNA oligóval hibridizált metszetek esetén kapott rendkívül erős jelintenzitással szemben az RNS oligóval alig volt kimutatható a miRNS. A miR171\_DNS oligóval nem tudtunk miRNS-t kimutatni (9. D ábra). Negatív kontrollként itt is a miR124\_LNA oligót használtuk (9. E ábra). Mindezek alapján tehát az LNA oligók nagyon hatékonyan tudják kimutatni a miRNS-eket *in situ* hibridizációs kísérletekben.

#### Az LNA oligók specifikusságának vizsgálata *in situ* hibridizálás során

A következőkben megvizsgáltuk, hogy az LNA oligók az *in situ* hibridizációs kísérletekben is a northern blot kísérletekben tapasztaltakhoz hasonlóan specifikusak-e. Ehhez *N. benthamiana* növények fiatal és idősebb leveleit az előző kísérlethez hasonlóan ágyasztuk





**10. ábra** *Nicotiana benthamiana* levél keresztmetszetek *in situ* hibridizálása LNA oligonukleotidokkal.

*N. benthamiana* fiatal (balra) és idősebb (jobbra) egymást követő metszetek hibridizálása 3'-DIG jelölt miR171\_LNA (vad típusú) (A), miR171\_LNA/MM11 (1 mismatchet tartalmazó) (B), miR171\_LNA/2MM (2 mismatchet tartalmazó) (C) és negatív kontrollként miR124\_LNA egér specifikus (D) oligonukleotid próbákkal. A piros betű a mismatch nukleotidokat, a sáv (A ábrán) 200 µm-t jelöl.

paraffinba és készítettünk 10 µm-es egymást követő metszeteket. Ezeket hibridizáltuk a már korábban ismertetett miR171\_LNA (LNA3), a mismatcheket tartalmazó (miR171\_LNA/MM11, miR171\_LNA/2MM), és miR124\_LNA egér oligókkal (1. táblázat). Az oligókat 3' végükön digoxigeninnel jelöltük. A tökéletesen komplementer miR171\_LNA oligóval hibridizált minták esetén erős jeleket kaptunk a levélszövetben (10. A ábra). Ezzel szemben a mismatchet tartalmazó oligókkal alig láthatóak voltak a jelek (10. B-C ábra). A northern blotnak megfelelően itt sem adott háttérrel a negatív kontrollként használt egér miR124\_LNA oligó (10. D ábra). Úgy tűnt tehát, hogy az LNA oligóval *in situ* hibridizálás során is hatékonyan lehet kimutatni miRNS-t és 1 nt eltérés ebben az esetben is jelentősen csökkenti a hibridizációs jelet, vagyis a kapott jel specifikus.

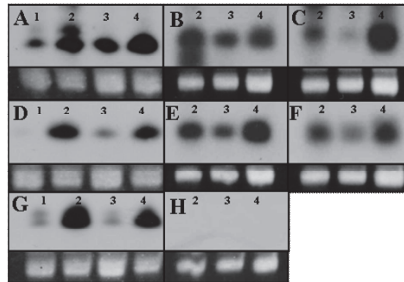
### Az *in situ* hibridizáláshoz használt tesztnövények

Az *in situ* hibridizációs kísérleteket először a csoportunkban általánosan használt *N. benthamiana* növényeken végeztük. Ennek előnye, hogy virológiai szempontból jól karakterizált tesztnövény, és rendkívül alkalmas *in situ* hibridizálásra. Hátránya viszont, hogy nem áll rendelkezésünkre megfelelő információ a genetikai háttérrel, ezért szerettük volna megvizsgálni, hogy a modellnövényként általánosan használt és genetikailag jól karakterizált *A. thaliana* növények és a *N. benthamiana* növények is ugyanazt a miRNS expressziós mintázatot mutatják-e.

Az *A. thaliana*-nak ugyan teljes genom szekvenciája rendelkezésre áll, *in situ* hibridizálásra azonban nehezebben használható. Először tehát be kellett állítanunk egy olyan rendszert, mely alkalmas *A. thaliana* növények *in situ* hibridizálásra. Ez elsősorban a szövetek fixálási és paraffinba ágyazási körülményeinek megváltoztatását jelentette. Ellentétben a *N. benthamiana* szövetek hibridizálásához használt, 3' végükön digoxigeninnel jelölt LNA próbákkal, az *A. thaliana* szöveteken végzett *in situ* hibridizációs kísérletekhez mindkét végükön jelölt LNA próbákat használtunk fel. Negatív kontrolként az egér miR124\_LNA próba mellett egy szintén mindkét végén jelölt csirke miRNS-re tervezett próbát használtunk fel (miR449\_LNA), mellyel ugyancsak nem volt kimutatható háttéraktivitás (16. ábra).

### Az *in situ* hibridizáláshoz felhasznált LNA próbák

A microRNA Registry database (Griffiths-Jones et al., 2006) segítségével konzervatív, fejlődésszabályozában résztvevő miRNS-eket választottunk ki, melyekre LNA próbákat terveztünk. Ezeket a miR156, miR159, miR160, miR167, miR164 és miR319 kimutatására készített próbákat *A. thaliana* és *N. benthamiana* totál RNS kivonatokkal készített northern blot analízis segítségével igazoltuk (11. ábra). A northern blot kísérletekkel a miRNS-ek mindegyikét sikerült mind *A. thaliana*, mind *N. benthamiana* kivonatból kimutatni, és minden esetben erős hibridizációs jelet kaptunk. Az egér specifikus miR124\_LNA próbával ebben az esetben sem volt kimutatható háttér. Oligóink tehát alkalmasnak tűntek *in situ* hibridizációs kísérletek elvégzésére különböző növényfajokon.



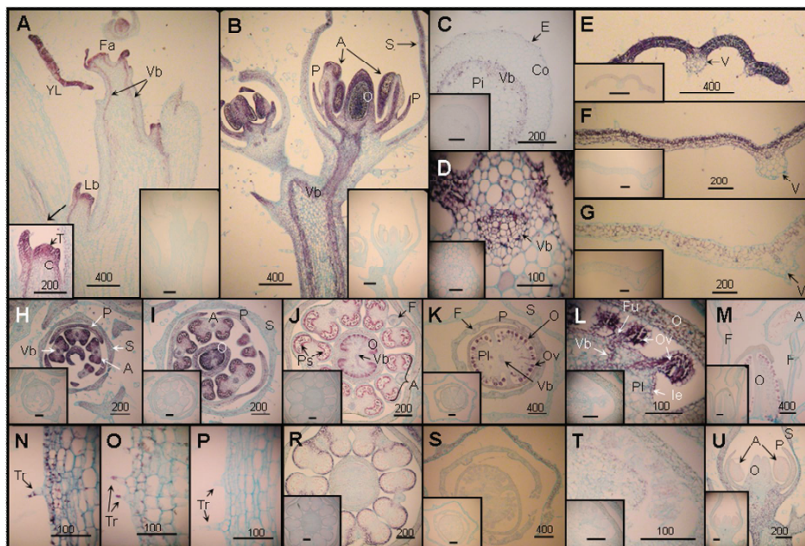
**11. ábra** A miRNS-ek akkumulációjának vizsgálata northern blot analízissel *N. benthamiana*-ban és *A. thaliana*-ban

*N. benthamiana* fiatal levél (1), csúcs (2), virág (3) és *A. thaliana* (4) csíranövény totál RNS kivonatok (10 µg/zseb) elválasztva 12%-os denaturáló poliakrilamid gélen és hibridizálva különböző LNA oligonukleotid próbákkal: miR164\_LNA (A), miR171\_LNA (B), miR156\_LNA (C), miR160\_LNA (D), miR159\_LNA (E), miR319\_LNA (F), miR167\_LNA (G) és miR124\_LNA (H). Az ábrák alsó részén a mennyiségi kontrolok láthatók.

### A miRNS-ek expressziós mintázatának vizsgálata *in situ* hibridizációval *N. benthamiana* és *A. thaliana* növényekben

#### A miR171 akkumulációjának vizsgálata

A GRAS gén családba tartozó SCARECROW (SCR) fehérje a gyökér és a csúcs sugárirányú mintázatának kialakításában, ill. a hormon szignalizációban játszik meghatározó szerepet (Helariutta et al., 2000; Kamiya et al., 2003; Wysocka-Diller et al., 2000). Elsődleges funkciója az aszimmetrikus sejtosztódás szabályozása. Szintén a GRAS gén családba tartoznak a SCARECROW-like (SCL) feltételezett transzkripciós faktorok, melyek közül kettőt, az SCL6-III-at és az SCL6-IV-et a miR171 hasítással szabályozza *A. thaliana*-ban (Llave et al., 2002; Pysh et al., 1999). Ezen kívül még a SCL6-II tartalmaz tökéletesen komplementer miR171 felismerő helyet (Reinhart et al., 2002).



**12. ábra** A miR171 expresszió *N. benthamianában*

(A, B) Csúcs és fejlődő virág hosszmetset. Bal alsó sarokban oldalmerisztéma nagyítása látható. A többi kis négyzetben (A-M) a negatív kontrollként miR124\_LNA próbával hibridizált metsetek láthatók

(C) fiatal szár keresztmetszet,

(D) levélér keresztmetszet.

(E-G) levél keresztmetszetek fejlődési stádiumuk szerinti sorrendben

(H-J) fejlődő virág keresztmetszetek fejlődési stádiumuk szerinti sorrendben

(K-L) magház keresztmetszet, (M) magház hosszmetset, (N-P) fiatal szár hosszmetset miR171\_LNA próbával hibridizálva (N), sejtmagfestéssel (O) és negatív kontrollként miR124\_LNA próbával hibridizálva.

(R-U) GAPDH mRNA expresszió vizsgálata antisense RNS próbával. Jobb alsó sarokban a negatív kontrollként sense RNS próbával hibridizált metszetek láthatók. Virág keresztmetszet (R), magház keresztmetszet (S-T) és magház hosszmetset (U).

Fa – virágmerisztéma (floral apex), Vb – szállítószövet (vascular bundle); YL – fiatal levél (young leaf), Lb – oldalmerisztéma (lateral bud), O – magház (ovary); Ov – magkezdemény (ovule); S – csészé (calyx, sepals); P – szirm (corolla, petals); A – porzó (anther); Ps – portokfélf (pollen sac); F – filament; Pl – placenta; Fu – funiculus; Ie – inner epidermis; V – ér (vein); Tr – trichome; T – tunica; C – corpus; Pi – bél (pith); Co – kéreg (cortex); E – epidermis. A sávok az ábrán feltüntetett méretet jelölik um-ben.

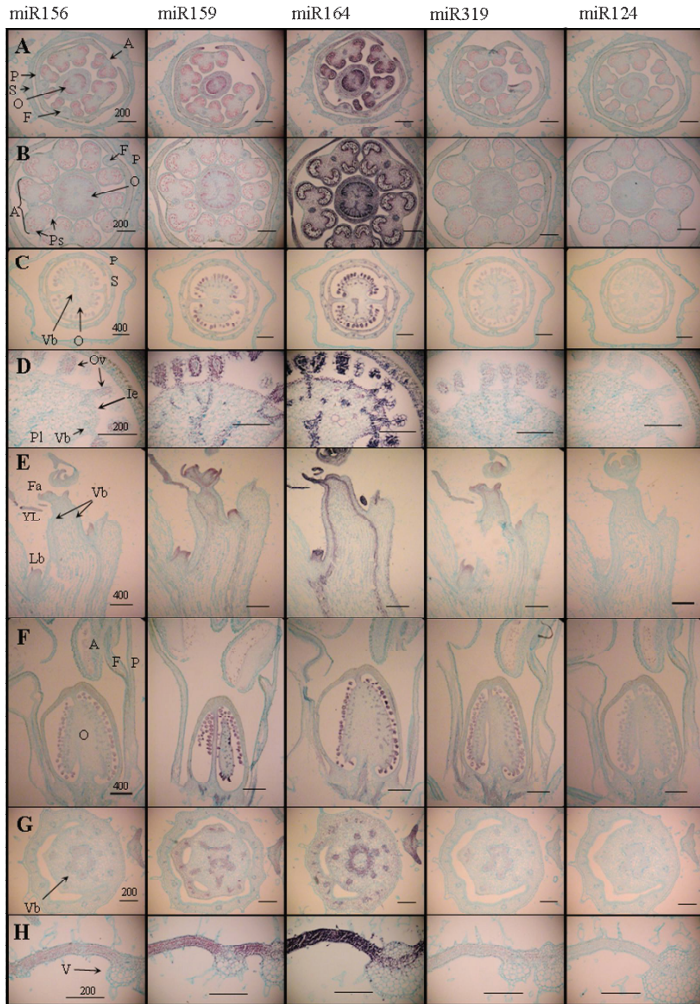
*In situ* hibridizációval megvizsgáltuk a miR171 expressziójának mintázatát különböző korú *N. benthamiana* szövettypusokon (12. ábra). Csúcs hosszszelvényekben a miR171 a merisztéma tunica és corpus részén egyaránt jól megfigyelhető volt (12. A ábra). Ezen felül erős jeleket kaptunk a szállítószövetekben. Az edénynyalábokhoz hasonlóan erős volt a miR171 akkumuláció a fiatal szár keresztmetszetén (12. C ábra), a levélér keresztmetszetén

(12. D ábra) és a fiatal virág hosszmetsetén (12. B ábra) is. A szár keresztmetseten megfigyeltünk jelet az epidermális sejtrétegben is (12. C ábra). Magas szinten fejeződik ki a miR171 a levélprimordiumokban és a fiatal levelekben, majd a levélszövetek fejlődésével a miRNS szint fokozatosan csökken (12. E-G ábra). A sejtmag kémiai festődési mintázatával összehasonlítva a miR171 hibridizálás eredményét az epidermisz sejtekben és a trichomában, úgy tűnik, hogy a miR171 a sejtmagban van jelen (12. N-O ábra). Ez egybevág a korábbi irodalmi adatokkal, mely szerint az *A. thaliana* sejtmag tartalmaz érett miRNS-eket (Park et al., 2005). Különböző fejlődési stádiumú virág keresztmetsetek hibridizálása azt mutatta, hogy a magház, a portokok és a szíromlevelek nagy mennyiségben fejezik ki a miR171-et (12. B, H-J ábra). Jól megfigyelhető, hogy a portokon belül a pollen szemek és a filamentek is nagy mennyiségű miRNS-t tartalmaznak. A fejlődő magházon belül a magkezdeményekben, a funikuluszban, a belső epidermiszben és a szállítószövetekben egyaránt erős jelek láthatók (12. K-M ábra).

Összehasonlítottuk a miR171 és egy háztartási gén expressziós mintázatát, melyhez glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH)-specifikus RNS próbát használtunk fel (12. R-U ábra). A GAPDH próbával kapott mintázat a különböző fejlődési stádiumban lévő virág mintákon nagyjából ellentéte volt a miR171 expressziós mintázatának, ami arra utal, hogy a vizsgált *N. benthamiana* virág szövetekben a miR171 a metabolikusan inaktív szövetekben fejeződik ki (12. J-M és R-U ábrák). A miR171 szabályos expressziós mintázata, a kapott jelek erőssége, és hogy mindez fennmarad a különböző fejlődési stádiumban lévő virágokban, arra utal, hogy a miRNS akkumulációja térben és időben jól szabályozott a fejlődés folyamán.

#### A miR156 akkumulációjának vizsgálata

A miR156 az SPL (SQUA promoter-binding protein-like) géncsalád 16 ismert tagjából vélhetően 11-et szabályoz (Jones-Rhoades and Bartel, 2004; Rhoades et al., 2002). Az *A. thaliana* SPL géncsaládja strukturálisan különböző génekből áll, melyek feltételezhetően olyan transzkripció faktorokat kódolnak, melyek csak növényekben vannak jelen (Cardon et al., 1999). Közös jellemzőjük az SBP-box (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-box), mely egy erősen konzervált DNS-kötő domént kódol. A miR156 túlexpresszálo *A. thaliana* növényeknél gyorsabb levéliniciációt, csökkent apikális dominanciát és későbbi virágzást figyeltek meg (Schwab et al., 2005).



**13. ábra** miRNS akkumuláció *N. benthamiana*-ban

miR156, miR159, miR164 és miR319, ill. negatív kontrollként egér miR124 LNA próbákkal hibridizált szövetek. (A vizsgált miRNS-eket az oszlopok tetején tüntettük fel.)

(A-B) fejlődő virág keresztmetszet

(C-D) magház keresztmetszet

(E) csúcs hosszmetset

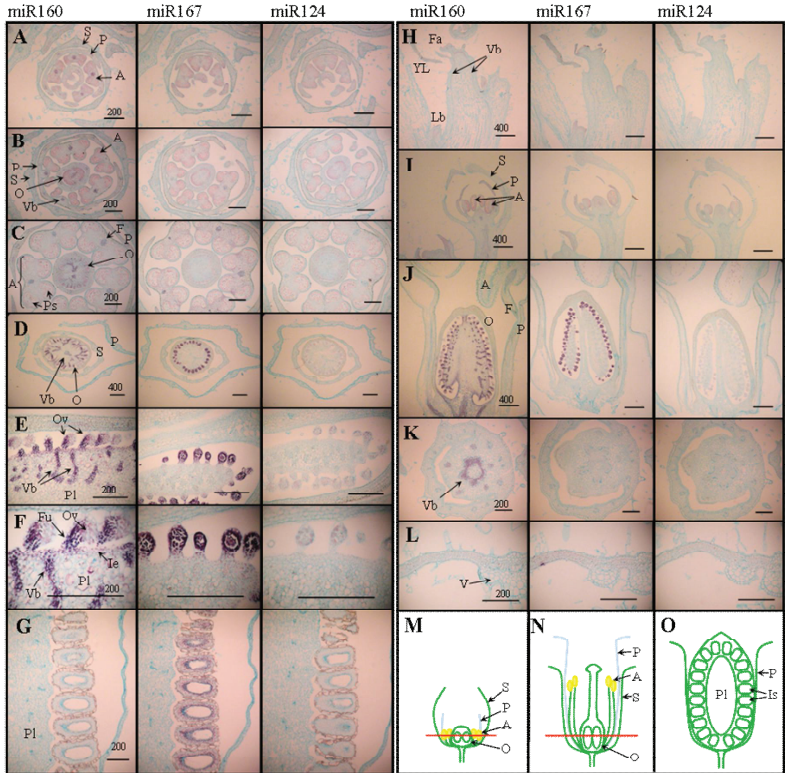
(F) virág hosszmetset

(G) virág alapi részének keresztmetszete

(H) levél keresztmetszet

Fa - virágzati csúcs (floral apex); Vb - szállítószövet (vascular bundle); YL - fiatal levél (young leaf); Lb - oldalmerisztéma (lateral bud); O - magház (ovary); Ov - magkezdemény (ovule); S - csésze (calyx, sepals); P - szirom (corolla, petals); A - porzó (anther); Ps - portokfél (pollen sac); F - filament; Pl - placenta; le - inner epidermis; V - ér (vein); A sávok az ábrán feltüntetett méretet jelölik μm-ben.





**14. ábra** miRNS akkumuláció *N. benthamiana*-ban

miR160 és miR167, ill. negatív kontrollként egér miR124 LNA próbakkal hibridizált szövetek. (A vizsgált miRNS-eket az oszlopok tetején tüntettük fel.)

(A-B) fejlődő virág keresztmetszet

(C-D) magház keresztmetszet

(E-F) magház hosszszelvény

(G) fejlődő termés hosszszelvénye fejlődő magokkal,

(H) csúcs hosszszelvény

(I-J) fejlődő virág hosszszelvény

(K) virág alapi részének keresztmetszete

(L) levél keresztmetszet

(M-O) a virágfejlődés stádiumainak sématis rajza, a piros vonal a metszetek helyét jelöli: (M) felel meg az (A-C) ábrákon látható metszetek fejlődési stádiumainak, (N) felel meg (D-F, J) és (O) felel meg a (G) ábrának.

Fa - virágzati csúcs (floral apex); Vb - szállítószövet (vascular bundle); YL - fiatal levél (young leaf); Lb - oldalmerisztéma (lateral bud); O - magház (ovary); Ov - magkezdemény (ovule); S - csésze (calyx, sepals); P - szirm (corolla, petals); A - porzó (anther); Ps - portokfél (pollen sac); F - filament; Pl - placenta; Fu, funiculus; Ie - inner epidermis; V - ér (vein); Is - fejlődő mag (immature seeds). A sávok az ábrán feltüntetett méretet jelölik  $\mu\text{m}$ -ben.

*N. benthamiana* és *A. thaliana* növényeken végzett *in situ* hibridizációs kísérleteink alapján szintén arra következtethetünk, hogy a miR156 szerepet játszik a levél- és virágfejlődésben. *N. benthamiana*-ban a miR156a gyenge expressziót mutatott a fiatal, fejlődő virágokban (13. A-B ábra, első oszlop), míg az idősebb virágokban a jelintenzitás a technikai háttérnél nem volt erősebb (13. C-D ábra). A fiatal levelekben és a merisztémában ezzel szemben jól kimutatható volt a miR156 (13. E, H ábra).

A *N. benthamiana* szövetekhez hasonlóan *A. thaliana*-ban is elsősorban a fiatal levelekben, csúcs- és virágmerisztémában expresszáldott a miR156 (15. B-D ábra). Jól látható jeleket kaptunk a fejlődő virágokban a termőben és a porzóban is (15. E-F ábra), ill. a gömb és szív stádiumban lévő embriókban (15. H-I ábra). Szintén megjelent a miR156 az edénynyalábokban (15. D-F ábra).

#### A miR164 expresszió vizsgálata

A miR164 vélhetően a NAM/ATF/CUC (NAC) doménnal rendelkező transzkripciósfaktor család 5 tagját szabályozza (Rhoades et al., 2002). Ezek közül a CUP-SHAPED COTYLEDON1 (CUC1) és CUC2 a merisztéma fejlődésben és a szervek szeparációjában játszik szerepet (Aida et al., 1997), míg a NAC1 az auxin szignál szállításán keresztül az oldalgyökér fejlődéshez szükséges (Xie et al., 2002). A CUC1-ről (Mallory et al., 2004) és CUC2-ről (Laufs et al., 2004) korábban igazolták, hogy a miR164 szabályozása alatt áll.

A miR164-et túlexpresszálo transzgenikus növények összenőtt virággal és vegetatív szervekkel rendelkeztek, ill. módosult a különböző virágszervek száma. Azon transzgenikus növények viszont, melyekben *CUC1* vagy *CUC2* mRNS-en a miR164 felismerő hely mutáns, vagyis a miR164 hasításra rezisztensek, rendellenes levelekkel fejlődtek (Laufs et al., 2004; Mallory et al., 2004).

*N. benthamiana* növények *in situ* hibridizálása során a miR164 expresszió a miR171-hez hasonló expressziós mintázatot mutatott (13. ábra 3. oszlop). Az irodalomban leírt transzgenikus növények fenotípusának megfelelően rendkívül erős jeleket kaptunk a különböző stádiumban lévő fejlődő virágszervekben, a magházban, a portokokban, a szirmokban (13. A-B ábra) és a fiatal levelekben is (13. H ábra). Az idősebb virágban a magkezdeményekben, a belső epidermiszben és a szállítószövetekben volt erős miR164 akkumuláció (13. D ábra). A szállítószövetekben minden szervnél jól megfigyelhető jeleket kaptunk.



*A. thaliana* növények esetében is a *N. benthamiana* növényekkel azonos expressziós mintázatot kaptunk, erős volt az expresszió a fejlődő szövetekben, merisztémákban (15. C-D ábra), a fiatal levelekben (15. B ábra), a porzóban, a termőben (15. D-F ábra), az embrióban (15. H-I ábra) és a szállítószövetekben is.

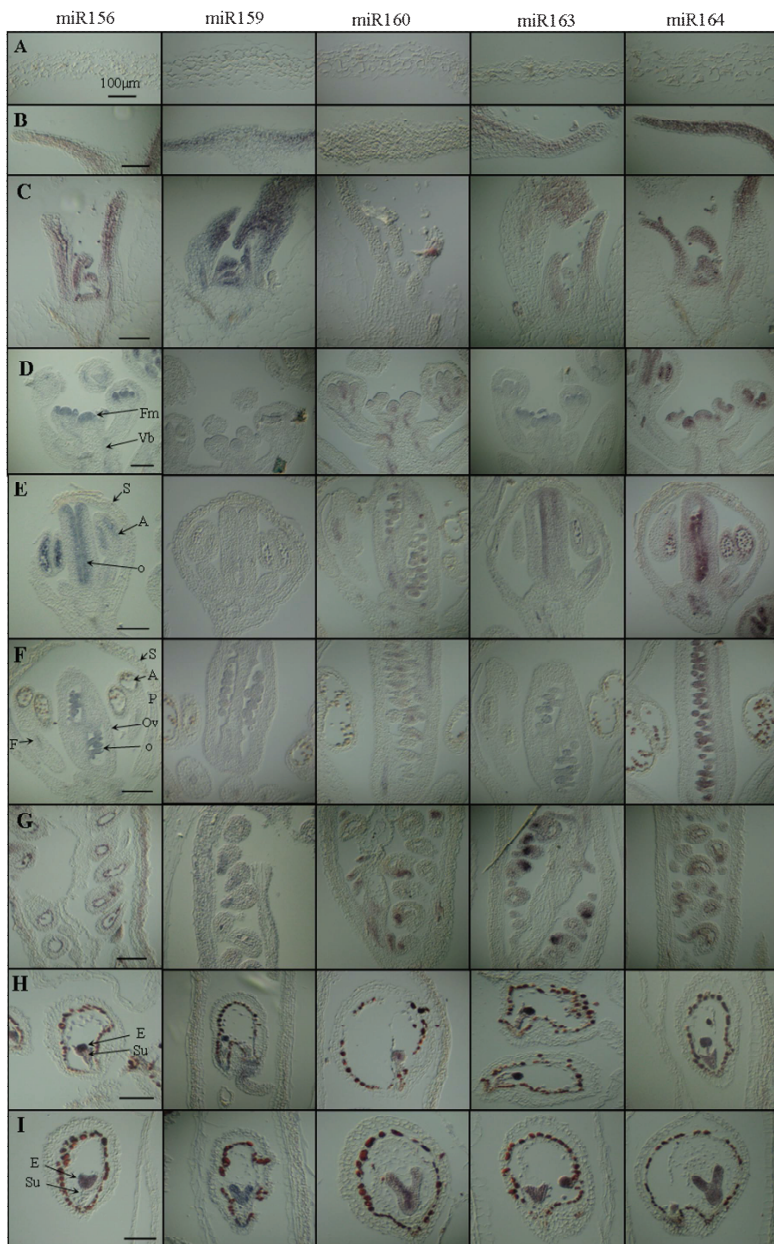
#### A miR159 és miR319 akkumulációjának vizsgálata

A miR159 irányítja a GAMYB rokon fehérjék mRNS-ének hasítását (Achard et al., 2004). A GAMYB egy GA (giberellinsav) vezérelt transzkripciósi faktor, mely a levél- és virágfejlődésben vesz részt. A GAMYB mellett a miR159 akkumuláció is GA-szabályozott. A miR159 túltermelő transzgenikus növényeknek rendellenes a porzó fejlődése és rövid nappalos körülmények között késleltetett a virágzásuk.

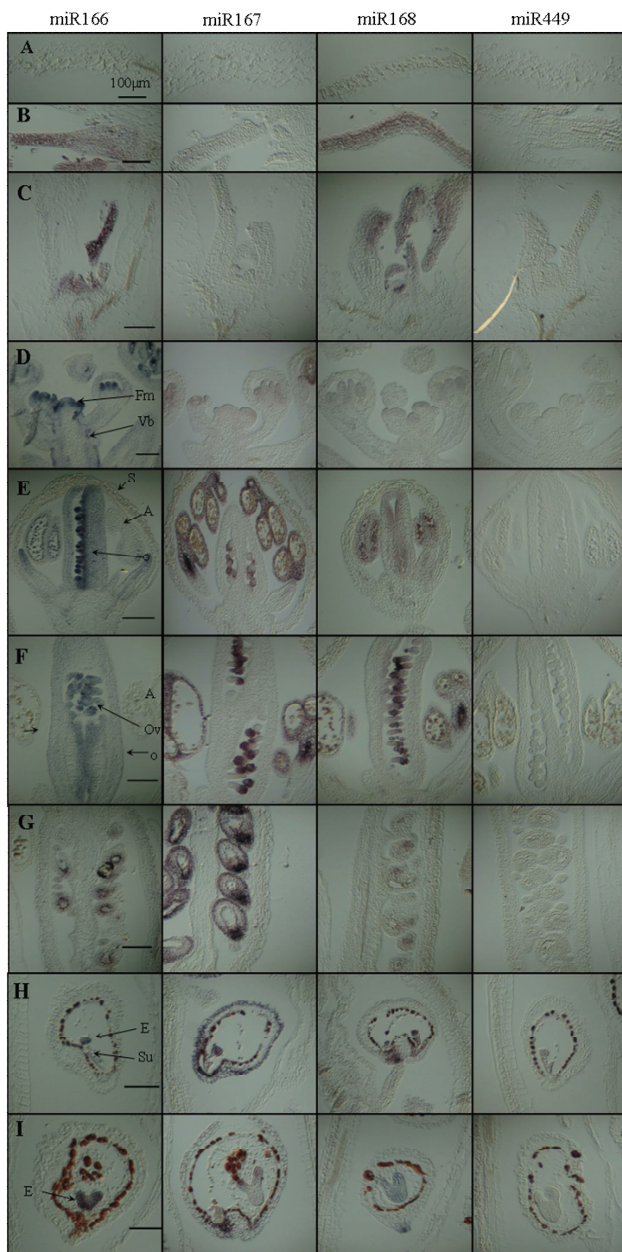
Az *in situ* hibridizációs kísérletekben a miR159 *N. benthamiana* szöveteken hasonló expressziós mintázatot mutatott, mint a miR171 és a miR164 (13. ábra 2. oszlop). Az irodalomban közölt transzgenikus kísérletek alapján várt expresszióval szemben és a *N. benthamiana* hibridizálástól eltérően az *A. thaliana* virágmerisztémában nem tudtunk miRNS-t kimutatni (15. D ábra), valamint a fejlődő virágokban is csak alig volt látható hibridizációs jel (15. E-F ábra). Erős volt ezzel szemben az expresszió a fiatal levelekben, a csúcsmerisztémában (15. B-C ábra) és az embriókban (14. H-I ábra). A miRNS a fejlődő magok funikuluszában is jól kimutatható volt.

A miR319 (miR-JAW) a miR159-cel azonos miRNS családba tartozik, szekvenciájuk hasonló. A miR319 a levélfejlődésben szerepet játszó TCP gének mRNS-einek hasításában vesz részt. A miR319-et túltermelő növények később virágoznak, zöld szirmokkal és rendellenes levelekkel fejlődnek. Szintén rendellenes levelekkel és csökkent apikális merisztémával rendelkeznek a miR319 hasításra rezisztens TCP2 és TCP4 termelő transzgenikus növények (Palatnik et al., 2003).

*N. benthamiana* növényeknél a miR319 akkumuláció a fiatal virágokban alig volt megfigyelhető (13. A-B ábra 4. oszlop), a fejlődő magházban a magkezdeményben, ill. a szállítószövetekben volt jelen (13. D ábra). Az irodalmi adatok alapján vártak megfelelően, jól látható jeleket kaptunk a fiatal levelekben és a merisztémában (13. H és E ábra).



15. ábra



16. ábra

### A miR163 expressziós mintázatának vizsgálata

Célunk volt olyan miRNS expressziójára meghatározása is, melynek célszekvenciája eddig nem ismert, ezért kiválasztottuk a miR163-at. Az *in situ* hibridizációs kísérletek során a miR163 gyenge expressziót mutatott a merisztémában (15. C és D ábra), a fiatal levélben (15. B ábra) és a fejlődő virágokban (15. E és F ábra). Erős jeleket kaptunk viszont a fejlődő magkezdeményekben (15. G ábra) és az embriókban (15. H és I ábra).

### A miR165/166 expressziós mintázatának vizsgálata

A miR165 és miR166 egy géncsaládba tartozó miRNS-ek, melyek egymástól egyetlen nukleotidban térnek el. A miR165/166 a HD-ZIP (class III homeodomain leucine zipper) transzkripciós faktor családba tartozó PHABULOSA (PHB), PHAVOLUTA (PHV), REVOLUTA (REV), ATHB8 és ATHB15 (más nevén CORONA, CNA) géneket szabályozzák (Emery et al., 2003; Juarez et al., 2004). Különböző mutáns növényekkel végzett kísérletek azt mutatták, hogy ezek a csúcsmerisztéma, a szállítószövet rendszer és a levelek adaxiális/abaxiális tengelyének kialakításában játszanak szerepet (Kim et al., 2005; McConnell et al., 2001; Williams et al., 2005).

#### **15. ábra miRNS akkumuláció *A. thaliana*ban**

miR156, miR159, miR160, miR163 és miR164 LNA próbákkal hibridizált szövetek. (A vizsgált miRNS-eket az oszlopok tetején tüntettük fel. A negatív kontrol a 16. ábrán látható.)

(A) idősebb (B) fiatal levél keresztmetszet

(C) csúcs-, (D) virágmerisztéma hosszsmetszet

(E-G) fejlődő virág hosszsmetszet, fejlődési stádiumuk szerinti sorrendben

(G-H) fejlődő magok metszete, fejlődő embrióval

Fm - virág merisztéma (floral meristem); Vb - szállítószövet (vascular bundle); O - magház (ovary);

Ov - magkezdemény (ovule); S - csésze (calyx, sepals); P - szirm (corolla, petals); A - porzó (anther); E - embrio, S - suspensor. A sávok 100 µm-t jelölnek.

#### **16. ábra miRNS akkumuláció *A. thaliana*ban**

miR166, miR167 és miR168 ill. negatív kontrolként csirke miR449 LNA próbákkal hibridizált szövetek. (A vizsgált miRNS-eket az oszlopok tetején tüntettük fel.)

(A) idősebb (B) fiatal levél keresztmetszet

(C) csúcs-, (D) virágmerisztéma hosszsmetszet

(E-G) fejlődő virág hosszsmetszet, fejlődési stádiumuk szerinti sorrendben

(G-H) fejlődő magok metszete, fejlődő embrióval

Fm - virág merisztéma (floral meristem); Vb - szállítószövet (vascular bundle); O - magház (ovary);

Ov - magkezdemény (ovule); S - csésze (calyx, sepals); P - szirm (corolla, petals); A - porzó (anther); E - embrio, S - suspensor. A sávok 100 µm-t jelölnek.

A miR166g-t túlexpresszázó *jabba-1D* (*jba-1D*) T-DNS inszerciós mutánsok megnagyobbodott merisztémával, abnormális levelekkel és szállítószövetekkel rendelkeztek (Williams et al., 2005). A *jba-1D* csíranövényekben a PHB, PHV és ATHB15 expressziós szintje jelentősen csökkent, míg a REV kissé növekedett, az ATHB8 pedig nem változott. Sokkal kisebb volt az expressziós szint változása a virágszervekben. A funkciónyeréses miR166a mutáns növényekben legjobban az ATHB15 szint csökkent, kisebb mértékben csökkent a PHB, PHV és ATHB8 mennyisége, viszont a REV mRNS szint ebben az esetben sem csökkent (Kim et al., 2005). Az eredmények azt mutatták, hogy a REV csak bizonyos szövetekben hasítódik, mint pl. a szállítószövetek. Amíg a PHB, PHV és REV egymástól eltérő expressziós mintázattal ugyan, de számos szövet típusban megjelenik, addig az ATHB8 és ATHB15 leginkább a szállítószövetekben expresszálódik és elsősorban ezek differenciációjában van szerepe (Emery et al., 2003; Kim et al., 2005).

*A. thaliana* szövetek *in situ* hibridizálásakor a miR166 erős expressziót mutatott a fiatal levelekben, a szállítószövetekben és az eddig vizsgált miRNS-ektől eltérően az epidermiszben is (15. B-D ábra). A fejlődő virágokban a termőben, a portokokban és a szíromlevelekben tudtunk miR166-ot kimutatni (15. E-F ábra). Szintén erős jelet kaptunk a gömb és szív stádiumú embriókban, az irodalmi adatoknak megfelelően az abaxiális részen (Williams et al., 2005). A korábban kukoricán végzett *in situ* hibridizációs kísérletek eredményeihez hasonlóan (Juarez et al., 2004), nagy mennyiségben volt jelen a miR166 a merisztéma perifériás részén, míg a centrális zónában nem kaptunk hibridizációs jelet (15. D ábra). Az irodalomban közzölt *in situ* hibridizációs eredmények azt mutatták, hogy a célszekvenciák expressziós mintázata a miR166-tal ellentétes, vagyis a merisztéma centrális zónájában és az embrió adaxiális részén vannak jelen (Emery et al., 2003; Williams et al., 2005).

#### Auxin válasz faktorok szabályzásában szerepet játszó miRNS-ek vizsgálata

Az auxin számos fejlődési folyamatért felelős, mint pl. az embrió organizáció, az új gyökérmerisztémák és szállítószövet-rendszer kialakítása, a sejtmegnyúlás és a csúcsdominancia szabályozása (Berleth and Sachs, 2001). Az auxin az Aux/IAA fehérjéken keresztül szabályozza a korai auxin-válasz géneket. Ezeknek a géneknek a promoter régiójában található Auxin-response element (AuxRE)-hez kötődnek az auxin válasz faktorok (auxin response factor, ARF), magas auxin koncentráció esetén homodimert, alacsony auxin koncentráció esetén az Aux/IAA fehérjékkel heterodimert alkotva. Így alacsony auxin

koncentráció esetén a heterodimer gátolja a korai auxin-válasz gének transzkripcióját, magas auxin koncentráció esetén viszont ezek a gének átíródnak (Hagen and Guilfoyle, 2002; Ulmasov et al., 1997; Ulmasov et al., 1999; Woodward and Bartel, 2005).

*A. thaliana*-ban 23 ARF található, melyek közül a miR160 az ARF10-et, ARF16-ot és ARF17-et, a miR167 az ARF6-ot és ARF8-at szabályozza (Mallory et al., 2005; Ulmasov et al., 1999). Azok a transzgenikus növények, melyekben az ARF6 vagy az ARF8 a miR167 hasításra rezisztens, kisebb levelekkel, rendellenesen fejlődött porzóval és termővel rendelkeznek. (Wu et al., 2006). Hasonló tüneteket mutatnak az *arf6 arf8* funkcióvesztéses dupla mutáns növények is: fejlődésük a virágbimbók kinyílása előtti stádiumban leáll, a porzószálak rövidek, a portokok nem nyílnak ki, termők rendellenesen fejlődnek. Az *arf6* vagy *arf8* egyes mutánsok csupán csökkent fertilitással rendelkeznek (Wu et al., 2006).

A miR160 hasításra rezisztens ARF10 transzgenikus növények kisebb rozettával, fogazott levelekkel, sárga fellevelekkel és csészelevéllel fejlődnek (Liu et al., 2007). Ehhez hasonlóan a miRNS hasításra rezisztens ARF17 transzgenikus növények is kisebbek, leveleik fogazottak, csökkent fertilitásúak, extra sziklevelekkel és kevesebb oldalgyökérrel rendelkeznek (Mallory et al., 2005). Az *arf10*, *arf16* dupla mutánsok, ill. a miRNS hasításra rezisztens ARF10 és ARF16 transzgenikus növények gyökércsúcsa rendellenesen fejlődik (Wang et al., 2005).

Indolecetsav kezelés hatására nem változik sem a miR160, miR164 és miR167, sem az ARF17 akkumulációja (Mallory et al., 2005).

Megvizsgálva a miR160 és miR167 akkumulációját *N. benthamiana* növényekben azt találtuk, hogy a fiatal, fejlődő szervekben, merisztémában ezek a miRNS-ek nagyon kis mennyiségben voltak jelen (14. A-C, H). Ezzel szemben erős, egymástól jelentősen eltérő expressziót mutattak az idősebb virágokban (14. D-F, J ábra). A miR160 a magkezdemények alapi részénél, a funikuluszban, belső epidermiszben és a placenta szállítószövetében akkumulálódott, míg a miR167 kizárólag a magkezdeményekben volt jelen. A virágok alsó részéről készült keresztmetszeten is jól megfigyelhető, hogy a virág edénynyalábjában csak a miR160 volt jelen (14. K ábra). A miR167 expresszió a fejlődő magoknál is megmaradt, míg a miR160 ebben a stádiumban nem volt kimutatható (14. G ábra). A northern blot (11. D, G ábra) eredményéhez hasonlóan a levélszövetben itt sem kaptunk jelet a miR160 ill. nagyon gyenge jelet kaptunk miR167 esetében (14. L ábra).

A *N. benthamiana*-hoz hasonló expressziós mintázatot kaptunk a miR160 és miR167 próbákkal hibridizált *A. thaliana* szövetek esetén. A fiatal, fejlődő szervekben, merisztémában ezek a miRNS-ek nagyon kis mennyiségben voltak jelen (15. B-D, 16. B-D ábra). A miR160 a



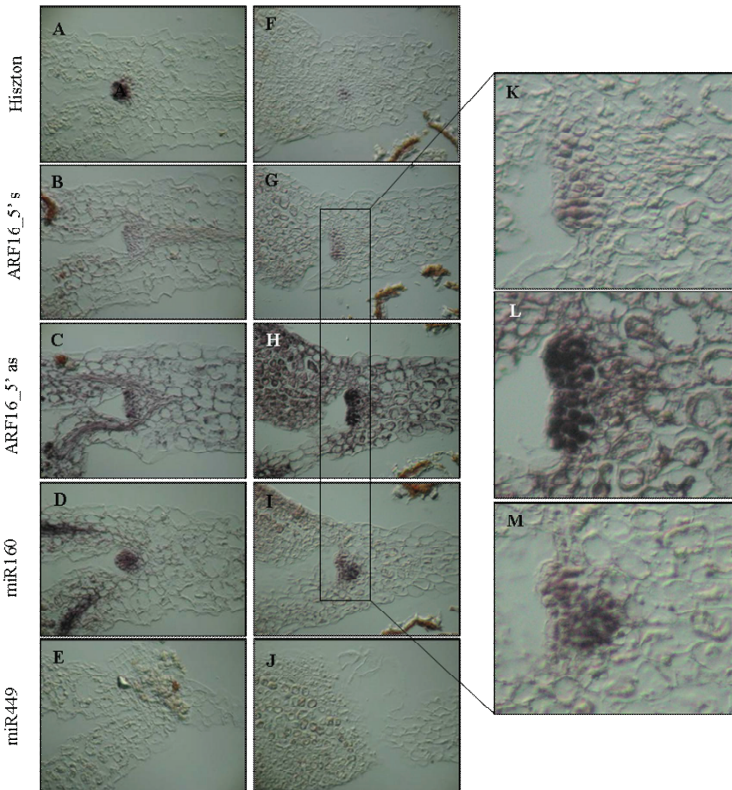
fejlődő virágokban erősödő expressziót mutatott a magkezdemények alapi részénél, a funikuluszban és a placenta szállítószöveiben (15. E-G ábra), míg a miR167 kizárólag a magkezdeményekben és a portokfalban volt jelen (16. E-G ábra). A szállítószövetekben itt is csak a miR160 próbával kaptunk jelet (15. D ábra). A korábbi *N. benthamiana* növényeken kapott eredményekhez hasonlóan a fejlődő maghépben itt is nagy mennyiségben volt jelen a miR167 (16. H ábra). Az embrióban mindkét miRNS jelen volt, de míg a miR160 az embrió szállítónyalábjában adott erősebb jelet (15. H-I ábra), addig a miR167 gradiens mentén helyezkedett el (16. H-I ábra). Ez az eltérés már a gömb stádiumú embriónál megfigyelhető volt és fennmaradt a szív, majd torpedó stádiumban lévő embrióknál is.

#### A miR160 és célszekvenciájának expressziós mintázata

A miRNS-ek által történő szabályozási mechanizmus vizsgálatára szerettük volna összehasonlítani a miR160, miR167 és célszekvenciák expressziós mintázatát. Ehhez a különböző *A. thaliana* szövetekből készítettünk egymást követő metszeteket, melyeket a miR160 és miR167 LNA, ill. az ARF6, ARF8, ARF10, ARF16 és ARF17 kimutatására tervezett digoxigenin jelölt RNS próbákkal hibridizáltunk.

Jól látható jeleket eddig csak az ARF16 esetében, csíranövényekből készült metszeteken kaptunk. A többi célszekvencia esetében az erős háttéraktivitás miatt nem volt értékelhető a kapott hibridizációs jel.

Az ARF16 a csíranövényekben erős expressziót mutatott a merisztéma perifériális részén (17. C, H és L ábra), míg a miR160 a centrális régióban akkumulálódott (17. D, I és M ábra). Ez alapján úgy tűnik, hogy a miR160 és célszekvenciája ellentétes expressziós mintázatot mutat, vagyis a miRNS a célszekvencia eltávolításán keresztül fejt ki hatását. Az L1 és L2 sejsorban látható gyenge átfedő expresszió miatt azonban nem zárható ki egy dózisfüggő szabályozás sem, bár az ezekben a sejtekben kapott háttéraktivitás miatt (17. G és K ábra) ez további vizsgálatokat igényel.



**17. ábra** A miR160 és célszekvenciájának expressziós mintázata *A. thaliana* csíranövényekben 4 napos csíranövényekről készített egymást követő metszetek 16  $\mu$ m (A-E) ill. 8  $\mu$ m (F-J) távolságban,  
 (A, F) hisztin as próbával (+ kontrol),  
 (B, G, K) ARF16 5' vég sense próbával (- kontrol),  
 (C, H, L) ARF16 5' vég antisense próbával,  
 (D, I, M) miR160 LNA próbával,  
 (E, J) miR449 LNA próbával (-kontrol) hibridizálva

#### A miR168 expressziós mintázatának vizsgálata

A miR168 a miRNS útvonal egyik kulcs komponensét, az AGO1-et szabályozza. A miR168 rezisztens Ago1 mRNS-t tartalmazó mutáns növények számos rendellenességet mutatnak, hasonlóan a *dcl1*, *hen1*, és *hyl1* mutánsokhoz, melyek szintén miRNS képződésben gátoltak (Vaucheret, 2008; Vaucheret et al., 2006; Vaucheret et al., 2004). Ezek a fejlődési



rendellenességek a vegetatív és a generatív szerveken egyaránt jelentkeznek, mint pl. a kisebb méret, aszimmetrikus rozetta levelek és steril virágok. A miR168-at túltermelő növények a vad típushoz képest később virágoznak, módosult virágzattal és mindkét oldalon adaxiális morfológiát mutató, fogazott levelekkel rendelkeznek.

A transzgénikus növényekben leírt fenotípusnak megfelelően, az *A. thaliana* szövetek *in situ* hibridizálása során a miR168 jól kimutatható volt a fiatal levelekben (16. B ábra), merisztémában (16. C ábra), a fejlődő virágokban a porzóban és a termőben is (16. E ábra). Az idősebb virágban a magkezdeményekben és a portokfalban kaptunk erős jeleket (16 F ábra). Szintén erős volt az expresszió a fejlődő embrióban (16. H-I ábra).

#### A miRNS-ek időbeli expressziója

A vizsgált miRNS-ek többsége jelen van a merisztémában és fiatal, fejlődő szervekben, szövetekben, embrióban, ami azt igazolja, hogy a miRNS-ek a differenciálódási és fejlődési folyamatokban játszanak fontos szerepet. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy a miRNS-ek mennyisége az idősebb szövetekben általában lecsökken. Így pl. az *A. thaliana* fiatal levélszövetekben a legtöbb miRNS jól kimutatható volt (15. és 16. B ábra), viszont nem kaptunk hibridizációs jelet az idősebb levélszövetekben (15. és 16. A ábra). Ezzel szemben találtunk olyan miRNS-eket is (pl. miR163; 15. ábra), melyek a fiatal virágszövetekben nem vagy csak alig voltak kimutathatók, majd az idősebb virágokban megnövekedett a mennyiségük. Szintén gyenge expressziót mutatott a miR160 és miR167 a fiatal *A. thaliana* (15. és 16. ábra) és *N. benthamiana* (14. ábra) virágokban is, majd az idősebb virágokban, a magkezdeményekben erős jeleket kaptunk.

#### A miRNS-ek térbeli expressziós mintázata

Sok miRNS adott erős hibridizációs jelet számos szövettípusban (pl. miR171, miR166, miR164), ami arra utal, hogy ezeknek a miRNS-eknek általános szerepe van a fejlődésszabályozásban. Ezek a miRNS-ek elsősorban az aktívan osztódó és differenciálódó sejtekben voltak jelen.

Az általunk vizsgált miRNS-ek közül 7 jelen volt az edénynyalábokban. Ez legerősebben a miR171-en, miR160-on, miR164-en és miR166-on volt megfigyelhető (12. B, 13. E, 14. J, 15-16. E ábra). Érdekes módon a miR167, mely a miR160-nal azonos géncsalád tagjait

szabályozza egyáltalán nem volt kimutatható az edénynyalábokból. Mindez azt bizonyítja, hogy a miRNS-ek jelenléte a szállítószövetekben aktívan szabályozott. Bár ezek az eredmények nem adnak választ arra a kérdésre, hogy ezek a miRNS-ek a szállítószövetekben keletkeznek-e vagy csak szállítódnak, de felmerül a lehetősége, hogy a miRNS-ek az edénynyalábokban mozogva irányítják a fejlődési folyamatokat. Ezeknek az eredményeknek megfelelően a *Cucurbita maxima* floémedvből számos olyan miRNS és siRNS jelenlétét mutatták ki, melyek szignalizációs folyamatokban vesznek részt (Yoo et al., 2004). Ezzel szemben transzgenikus növényekben a pre-miR171 expresszió és a miRNS aktivitása majdnem teljes átfedést mutatott (Parizotto et al., 2004).

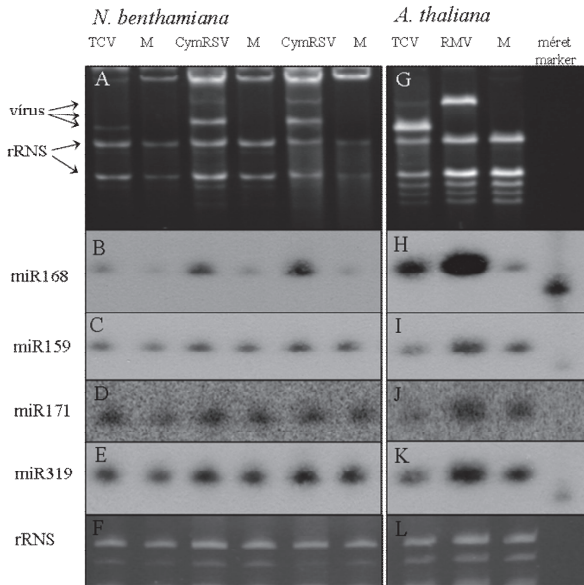
Legnagyobb különbséget az expressziós mintázatban a miR160 és miR167 mutatta (14-16. ábra). Az a tény, hogy ezek az egy géncsalád tagjait szabályozó miRNS-ek különbözőképp expresszálódnak, arra utal, hogy a célszekvenciák finomszabályozásában vesznek részt.

Hasonló következtetést vonhatunk le a miR165/166-ról és azok célszekvenciáiról közölt irodalmi adatokból. Az összesen 9 prekurzorból képződő érett miRNS-ek (melyekben összesen 1 nt eltérés található) a HD-ZIP (class III homeodomain leucine zipper) transzkripció faktor családba tartozó 5 mRNS-t szabályoznak. Különböző mutáns növényekkel végzett kísérletekből arra lehet következtetni, hogy a különböző prekurzorokból keletkező miR165/166 a szövetekben eltérő módon expresszálódik. Hasonló eredményt mutattak a különböző célszekvenciákról az *in situ* hibridizációs kísérletek. Ez a szövetenként eltérő miRNS expresszió bonyolult finomszabályozási rendszert tesz lehetővé.

### **A vírusfertőzés során szerepet játszó miRNS-ek vizsgálata**

Megvizsgáltuk, hogy különböző vírusfertőzések esetén hogyan változik a miRNS-ek expressziója. Ehhez *N. benthamiana* növényeket fertőztünk a laboratóriumunkban használt CymRSV és TCV vírusokkal, majd a fertőzési tünetek megjelenése után a szisztemikus levelekből össz-RNS-t tisztítottunk, és ezeket a mintákat kisRNS northern blot segítségével vizsgáltuk. Kutatócsoportunk korábbi eredményei és az irodalmi adatok (Zhang et al., 2006) azt mutatták, hogy a miR168 mennyisége vírusfertőzés hatására megnő. Ezért ezt és másik három, a levélben korábban erős expressziót mutató miRNS-t választottunk ki a kísérletekhez. Az általunk vizsgált miRNS-ek közül csak a miR168 szintje változott a vírus-

fertőzés hatására (18. B-E ábra), ez a korábbi irodalmi adatoknak megfelelően, a vírus akkumulációjával arányosan mindkét vírushatás hatására megnőtt.



**18. ábra** A miRNS-ek akkumulációjának változása vírushatás hatására northern blot analízissel *N. benthamianában* és *A. thalianában*

Vírushatározott *N. benthamiana* (A-F) és *A. thaliana* (G-L) totál RNS kivonatok, a különböző vírusokat az ábra tetején tüntettük fel.

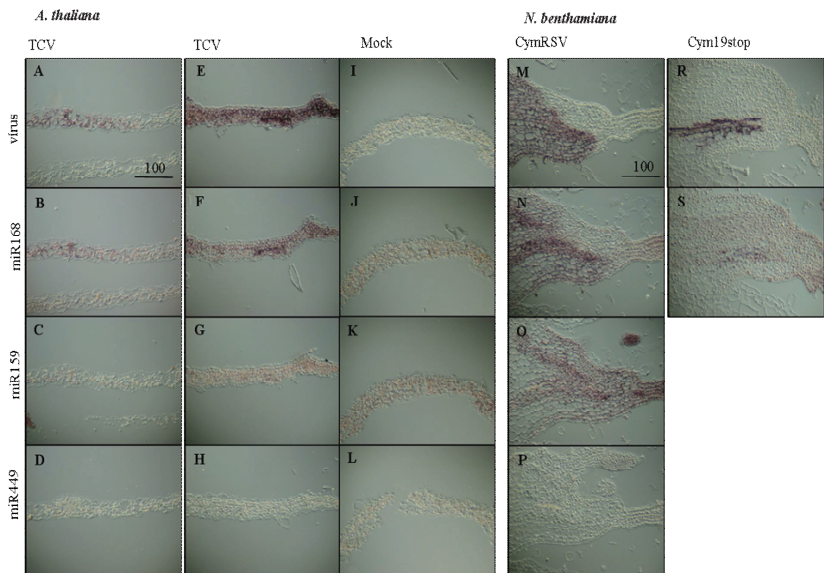
(A, G) vírus mennyisége a kivonatokban.

(B, H) miR168, (C, I) miR159 (D, J) miR171 és (E, K) miR319 felhalmozódás a vírushatározott mintákban.

(F, L) mennyiségi kontrollok.

Annak vizsgálatára, hogy ez a jelenség mennyire általános a különböző növényekben, *A. thaliana* növényeket fertőztünk TCV és *ribgrass mosaic virussal* (RMV), majd 1 hét elteltével a szisztémikus levelekből össz-RNS-t tisztítottunk, melyeket kisRNS northern blothoz használtunk fel. Az *A. thaliana* növények esetén a *N. benthamianához* hasonló eredményt kaptunk, a vírushatározott mintákban a miR168 szintje megnövekedett, míg a többi miRNS mennyisége változatlan maradt (18. H-K ábra). Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a vírushatározás hatására bekövetkező miR168 szint növekedés általános, vírustól és növénytől független reakció.

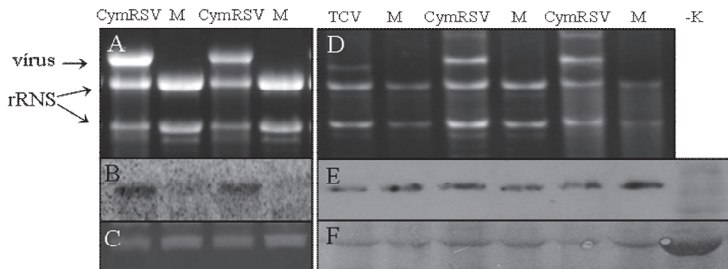
A továbbiakban megvizsgáltuk azt is, hogy a vírusfertőzés hatására megnövekedett miR168 a szövetekben milyen eloszlást mutat. Paraffinba ágyaztuk CymRSV fertőzött *N. benthamiana* és TCV fertőzött *A. thaliana* növények 5 ill. 7 napos szisztemikus leveleit, melyekről 10 µm-es, egymást követő metszeteket készítettünk. Ezeket digoxigeninnel jelölt vírusspecifikus RNS próbával (19. A, E, I és M ábra), miR168\_LNA próbával (19. B, F, J és N ábra) és miR159\_LNA próbával (19. C, G, K és O ábra) hibridizáltuk. *N. benthamiana* és *A. thaliana* növények esetében is jól látható volt, hogy a fertőzött mintákban a miR168 mennyisége megnövekedett és ez a megnövekedett jelerősség a víruspróbákkal megegyező szöveti eloszlást mutatott. Vagyis a miR168 mennyisége csak a vírus által fertőzött szövetekben nőtt meg. Ezzel szemben a miR159 expressziója a fertőzött szövetekben változatlan maradt.



**19. ábra A miRNS-ek akkumulációja vírusfertőzött *N. benthamiana* és *A. thaliana* szövetekben**

Vírusfertőzött *N. benthamiana* (A-L), *A. thaliana* (M-S) levélkeresztmetszetek. (A-H) TCV fertőzött szövet, (I-L) fertőzetlen szövet, (M-P) CymRSV fertőzött szövet, (R-S) Cym19stop fertőzött szövet hibridizálva vírusspecifikus (A, E, I, M és R), miR168\_LNA (B, F, J, N és S), miR159\_LNA (C, G, K és O) és miR449\_LNA (- kontrol, D, H, L és P) próbákkal. A sávok 100 µm-t jelölnek.

Mivel számos esetben kimutatták azt, hogy a vírusok szupresszor fehérjéje van hatással a miRNS útvonalra, ezért kísérleteinkhez egy olyan CymRSV vírust is felhasználtunk, mely nem kódolja a vírus szupresszor fehérjét, a p19-et. Ez az ún. Cym19stop vírus jóval kisebb mennyiségben halmozódik fel, mint a vad típusú vírus, mivel a PTGS gátolja a vírus elterjedését (Havelda et al., 2003). A szisztémikus levelekben a fertőzés a szállítószövetekre és azok környékére korlátozódik, a fertőzés folyamat lassabb és nem következik be csúcshalál. A Cym19stop vírussal fertőzött *N. benthamiana* növények 5 napos szisztémikus leveleiből szedett mintákat az előzőekhez hasonlóan ágyztuk be (19. R és S ábra). Az *in situ* hibridizációs kísérletek a CymRSV fertőzéshez hasonló eredményt mutattak, amely alapján úgy tűnik, hogy a p19-nek nincs szerepe a miR168 vírusfertőzés hatására bekövetkező expressziós szint változásában. A fertőzött növényben a miR168 szint emelkedése térben egybeesik a vírus felhalmozódásával, arra utalva, hogy vírus jelenléte közvetlenül váltja ki a miR168 fokozott felhalmozódását, és nem egy általános, egész növényre kiterjedő stressz válaszról van szó. A miR168 felhalmozódás szerepe a vírus fertőzés során egyelőre nem tisztázott, azonban mivel a miR168 az AGO1 mRNS-t szabályozza és az AGO1 szerepet játszik a vírus ellenállóságban (Morel et al., 2002), ezért elképzelhető, hogy a vírus a hatékonyabb fertőzés érdekében befolyásolja a miR168 expresszióját.



**20. ábra** Az Ago1 mRNS és az AGO1 fehérje szintje vírusfertőzött *N. benthamiana* kivonatokban

A különböző vírusokat az ábra tetején tüntettük fel, -K: *A. thaliana* fehérje kivonat.

(A, D) a vírusok mennyisége a kivonatokban

(B) Ago1 mRNS mennyisége, (E) AGO1 fehérje mennyisége, (C, F) mennyiségi kontrollok.

Mivel a miR168 a miRNS útvonal egyik kulcs komponensét, az AGO1-et szabályozza, kíváncsiak voltunk arra, hogyan változik a fertőzött növényekben az Ago1 mRNS ill. fehérje szint. Az mRNS szint vizsgálatához CymRSV fertőzött *N. benthamiana* növények szisztemikus leveleiről szedtünk mintát 6 nappal a fertőzés után, ezekből össz-RNS-t tisztítottunk. A mintákat northern blot segítségével vizsgálva azt találtuk, hogy a fertőzött növényekben az Ago1 mRNS szintje megnövekedett (20. B ábra).

Az AGO1 fehérje szintjének vizsgálatához a korábban már említett CymRSV és TCV fertőzött *N. benthamiana* növények szisztemikus leveleiből vettünk fehérje mintákat, melyeket western blot segítségével vizsgáltuk meg. CymRSV esetében 4 és 5, TCV fertőzés esetén 7 nappal a fertőzés után az AGO1 szintje nem mutatott változást (20. E ábra).

Ezek az eredmények a korábbi irodalmi adatoknak megfelelően azt mutatták, hogy az Ago1 mRNS szintje a vírusfertőzés hatására a miR168 szintjével párhuzamosan szintén megnő (Zhang et al., 2006). Várakozásainktól eltérően az AGO1 fehérje mennyisége viszont változatlan marad. Az a megfigyelés, hogy a miR168 és AGO1 mRNS szint emelkedés nem jár együtt a fehérje szint változásával, arra utal, hogy az általános miRNS szabályozástól eltérően az AGO1 translációs szinten szabályozódik a miRNS által, legalábbis a vírusfertőzött növényekben.

Ellentétben más, a miRNS hasításra rezisztens transzgénikus növényekkel, ahol a miRNS szint nem változik, a miR168 hasításra rezisztens transzgénikus növényekben az Ago1 mRNS mellett a miR168 szint is megemelkedett (Vaucheret et al., 2006). Változatlan maradt viszont a miR168 prekursor mennyisége ezekben a növényekben, amiből arra következtettek, hogy a megemelkedett Ago1 mRNS szint miatt feltételezhetően megnövekedett AGO1 fehérje stabilizálja a miR168-at (Vaucheret et al., 2006). Szintén transzgénikus növényeken végzett kísérletek azt mutatták, hogy a miR168 és az Ago1 expressziója a szövetekben egybeesik (Vaucheret et al., 2006).

Mivel az AGO1 az általános miRNS szabályozás központi enzime ezek az irodalmi és saját adataink arra utalnak, hogy az AGO1 fehérje szintjének beállítása rendkívül kifinomult módon szabályozott.

## Eredmények összefoglalása

Munkánk során a korábban általánosan használt DNS oligonukleotidok helyett ún. locked nucleic acid (LNA)- módosított oligonukleotid próbákat használtunk fel a miRNS-ek kimutatására.

A LNA oligókkal végzett northern blot hibridizációs kísérletek azt mutatták, hogy az LNA oligók érzékenysége kb. a 10-szerese a DNS oligókénak. Különböző mismatchet tartalmazó próbákkal végzett hibridizálások azt igazolták, hogy az LNA oligók specifikusak, képesek az egymáshoz nagyon hasonló, egy miRNS családba tartozó miRNS-ek elkülönítésére is.

Hasonlóan a northern blot kísérletekhez az LNA oligók kellően specifikusnak és érzékenynek bizonyultak *in situ* hibridizálás során is mind *N. benthamiana*, mind *A. thaliana* növények esetében.

Az *in situ* hibridizációs kísérletek azt mutatták, hogy a vizsgált miRNS-ek többsége jelen van a merisztémában és a fiatal, fejlődő szövetekben, szövetekben, embriókban. Mindez arra utal, hogy a miRNS-ek a differenciálódási és fejlődési folyamatokban játszanak fontos szerepet. A miRNS-ek a fiatal szövetekben vannak jelen nagyon mennyiségben, az idősebb szövetekben általában lecsökken a mennyiségük. Ezzel szemben találtunk olyan miRNS-eket is, melyek a fiatal szövetekben nem vagy csak alig voltak kimutathatók, majd az idősebb szövetekben megnövekedett a mennyiségük.

Az általunk vizsgált miRNS-ek közül számos jelen volt az edénynyalábokban. Mivel az egy géncsalád tagjait szabályozó miR160 és miR167 közül nem volt jelen mindkettő az edénynyalábokban, arra következtethetünk, hogy a miRNS-ek jelenléte a szállítószövetekben aktívan szabályozott.

Legnagyobb különbséget az expressziós mintázatban a miR160 és miR167 mutatta. Az a tény, hogy ezek az egy géncsalád tagjait szabályozó miRNS-ek különbözőképp expresszálódnak, arra utal, hogy ezek a miRNS-ek a célszekvenciák finomszabályozásában vesznek részt.

Összehasonlítva a miR160 és célszekvenciájának akkumulációját, ellentétes expressziós mintázatot kaptunk, ami alapján úgy tűnik, hogy a miR160 a célszekvencia eltávolításán keresztül fejt ki hatását.

Sok miRNS adott erős hibridizációs jelet több szövettípusban, mely alapján arra következtethetünk, hogy ezeknek általános szerepe van a fejlődésszabályozásban. Ezek a miRNS-ek elsősorban az aktívan osztódó és differenciálódó sejtekben voltak jelen.

A különböző vírusokkal fertőzött *N. benthamiana* és *A. thaliana* kivonatok és szövetek vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az általunk vizsgált miRNS-ek közül csak a miR168 mennyisége változott meg vírusfertőzés hatására. Ez a változás a szövetekben a fertőzött területekre korlátozódik. A fertőzés hatására bekövetkező miR168 expresszió növekedés növénytől és vírustól független, általános reakció.

A megnövekedett miR168 szinttel párhuzamosan a fertőzött szövetben a miR168 célszekvenciája, az Ago1 mRNS mennyisége is megnőtt, az általa kódolt fehérje mennyisége viszont változatlan maradt. Ez feltételezhetően arra utal, hogy a miR168 a célszekvencia hasítása mellett transzlációs gátlással is szabályozza az Ago1-et.



**Publikációs lista****A dolgozat anyagából megjelent publikációk**

- Havelda Z, Varallyay E, **Valoczi A**, Burgyan J (2008) Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. *Plant J* 55(2): 278-288.
- Wheeler G, **Valoczi A**, Havelda Z, Dalmay T (2007) In situ detection of animal and plant microRNAs. *DNA Cell Biol* 26(4): 251-255.
- Valoczi A**, Varallyay E, Kauppinen S, Burgyan J, Havelda Z (2006) Spatio-temporal accumulation of microRNAs is highly coordinated in developing plant tissues. *Plant J* 47(1): 140-151.
- Valoczi A**, Hornyik C, Varga N, Burgyan J, Kauppinen S, Havelda, Z.(2004) Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* 32(22): e175.

**Egyéb publikációk:**

- Havelda Z, Hornyik C, **Valoczi A**, Burgyan J (2005) Defective interfering RNA hinders the activity of a tombusvirus-encoded posttranscriptional gene silencing suppressor. *J Virol* 79(1): 450-457.
- Meraï Z, Kerenyi Z, Molnar A, Barta E, **Valoczi A**, Bisztray, G. Havelda, Z. Burgyan, J. Silhavy, D. (2005) Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *J Virol* 79(11): 7217-7226.

**Irodalomjegyzék**

- Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D.C. and Harberd, N.P. (2004) Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* 131(14), 3357-65.
- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H. and Tasaka, M. (1997) Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* 9(6), 841-57.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., Sung, G.H., Spatafora, J.W. and Carrington, J.C. (2004) Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* 36(12), 1282-90.
- Aukerman, M.J. and Sakai, H. (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell* 15(11), 2730-41.
- Bartel, B. and Bartel, D.P. (2003) MicroRNAs: at the root of plant development? *Plant Physiol* 132(2), 709-17.
- Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2), 281-97.
- Baulcombe, D. (2002) Viral suppression of systemic silencing. *Trends Microbiol* 10(7), 306-8.
- Baumberger, N. and Baulcombe, D.C. (2005) *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(33), 11928-33.
- Berleth, T. and Sachs, T. (2001) Plant morphogenesis: long-distance coordination and local patterning. *Curr Opin Plant Biol* 4(1), 57-62.
- Bondensgaard, K., Petersen, M., Singh, S.K., Rajwanshi, V.K., Kumar, R., Wengel, J. and Jacobsen, J.P. (2000) Structural studies of LNA:RNA duplexes by NMR: conformations and implications for RNase H activity. *Chemistry* 6(15), 2687-95.
- Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B. and Cohen, S.M. (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 113(1), 25-36.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B. and Cohen, S.M. (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3(3), e85.

- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L. and Voinnet, O. (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320(5880), 1185-90.
- Buck, K.W. (1996) Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. *Adv Virus Res* 47, 159-251.
- Burgyan, J., Hornyik, C., Szittyá, G., Silhavy, D. and Bisztray, G. (2000) The ORF1 products of tombusviruses play a crucial role in lethal necrosis of virus-infected plants. *J Virol* 74(23), 10873-81.
- Cardon, G., Hohmann, S., Klein, J., Nettesheim, K., Saedler, H. and Huijser, P. (1999) Molecular characterisation of the Arabidopsis SBP-box genes. *Gene* 237(1), 91-104.
- Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q. and Hannon, G.J. (2002) The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* 16(21), 2733-42.
- Carrington, J.C. and Ambros, V. (2003) Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301(5631), 336-8.
- Carrington, J.C., Heaton, L.A., Zuidema, D., Hillman, B.I. and Morris, T.J. (1989) The genome structure of turnip crinkle virus. *Virology* 170(1), 219-26.
- Carrington, J.C., Kasschau, K.D. and Johansen, L.K. (2001) Activation and suppression of RNA silencing by plant viruses. *Virology* 281(1), 1-5.
- Cerutti, L., Mian, N. and Bateman, A. (2000) Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci* 25(10), 481-2.
- Chapman, E.J., Prokhnevsky, A.I., Gopinath, K., Dolja, V.V. and Carrington, J.C. (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* 18(10), 1179-86.
- Chen, X., Liu, J., Cheng, Y. and Jia, D. (2002) HEN1 functions pleiotropically in Arabidopsis development and acts in C function in the flower. *Development* 129(5), 1085-94.
- Dalmay, T., Rubino, L., Burgyan, J., Kollar, A. and Russo, M. (1993) Functional analysis of cymbidium ringspot virus genome. *Virology* 194(2), 697-704.
- Dong, Z., Han, M.H. and Fedoroff, N. (2008) The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(29), 9970-5.
- Du, T. and Zamore, P.D. (2005) microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 132(21), 4645-52.

- Emery, J.F., Floyd, S.K., Alvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N.P., Izhaki, A., Baum, S.F. and Bowman, J.L. (2003) Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol* 13(20), 1768-74.
- Frieden, M., Christensen, S.M., Mikkelsen, N.D., Rosenbohm, C., Thru, C.A., Westergaard, M., Hansen, H.F., Orum, H. and Koch, T. (2003) Expanding the design horizon of antisense oligonucleotides with alpha-L-LNA. *Nucleic Acids Res* 31(21), 6365-72.
- Gallitelli, D., Hull, R. and Koenig, R. (1985) Relationship among viruses in the tombusvirus group: nucleic acid hybridization studies. *J. Gen. Virol* 66, 1523-31.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A. and Enright, A.J. (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34(Database issue), D140-4.
- Hacker, D.L., Petty, I.T., Wei, N. and Morris, T.J. (1992) Turnip crinkle virus genes required for RNA replication and virus movement. *Virology* 186(1), 1-8.
- Hagen, G. and Guilfoyle, T. (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol* 49(3-4), 373-85.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. and Baulcombe, D. (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *Embo J* 21(17), 4671-9.
- Han, M.H., Goud, S., Song, L. and Fedoroff, N. (2004) The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(4), 1093-8.
- Havelda, Z. and Burgyan, J. (1995) 3' Terminal putative stem-loop structure required for the accumulation of cymbidium ringspot viral RNA. *Virology* 214(1), 269-72.
- Havelda, Z., Hornyik, C., Crescenzi, A. and Burgyan, J. (2003) In situ characterization of Cymbidium Ringspot Tombusvirus infection-induced posttranscriptional gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J Virol* 77(10), 6082-6.
- Havelda, Z., Hornyik, C., Valoczi, A. and Burgyan, J. (2005) Defective interfering RNA hinders the activity of a tombusvirus-encoded posttranscriptional gene silencing suppressor. *J Virol* 79(1), 450-7.
- Heaton, L.A., Carrington, J.C. and Morris, T.J. (1989) Turnip crinkle virus infection from RNA synthesized in vitro. *Virology* 170(1), 214-8.
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wasycka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M.T. and Benfey, P.N. (2000) The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. *Cell* 101(5), 555-67.

- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C. and Voinnet, O. (2003) Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *Embo J* 22(17), 4523-33.
- Hull, R. (2002) *Matthews' Plant Virology*. Academic Press, Fourth edn. San Diego, California, USA:.
- Jackson, D.P. (1992) In situ hybridisation in plants. In *Molecular Plant Pathology: A Practical Approach* (Bowles, D.J., Gurr, S.J. and McPherson, M., eds). Oxford, UK: Oxford University Press, pp. 163-174.
- Jacobsen, S.E., Running, M.P. and Meyerowitz, E.M. (1999) Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* 126(23), 5231-43.
- Jones-Rhoades, M.W. and Bartel, D.P. (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14(6), 787-99.
- Juarez, M.T., Kui, J.S., Thomas, J., Heller, B.A. and Timmermans, M.C. (2004) microRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. *Nature* 428(6978), 84-8.
- Kamiya, N., Itoh, J., Morikami, A., Nagato, Y. and Matsuoka, M. (2003) The SCARECROW gene's role in asymmetric cell divisions in rice plants. *Plant J* 36(1), 45-54.
- Kasschau, K.D. and Carrington, J.C. (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95(4), 461-70.
- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A. and Carrington, J.C. (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Dev Cell* 4(2), 205-17.
- Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S.D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115(2), 209-16.
- Kidner, C.A. and Martienssen, R.A. (2004) Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature* 428(6978), 81-4.
- Kidner, C.A. and Martienssen, R.A. (2005) The developmental role of microRNA in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8(1), 38-44.
- Kim, J., Jung, J.H., Reyes, J.L., Kim, Y.S., Kim, S.Y., Chung, K.S., Kim, J.A., Lee, M., Lee, Y., Narry Kim, V., Chua, N.H. and Park, C.M. (2005) microRNA-directed cleavage of *ATHB15* mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant J* 42(1), 84-94.

- Kurihara, Y. and Watanabe, Y. (2004) Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(34), 12753-8.
- Kurreck, J., Wyszko, E., Gillen, C. and Erdmann, V.A. (2002) Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 30(9), 1911-8.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., Carrington, J.C., Liu, Y.P., Dolja, V.V., Calvino, L.F., Lopez-Moya, J.J. and Burgyan, J. (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *Embo J* 25(12), 2768-80.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D. and Burgyan, J. (2004) Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *Embo J* 23(4), 876-84.
- Laubinger, S., Sachsenberg, T., Zeller, G., Busch, W., Lohmann, J.U., Ratsch, G. and Weigel, D. (2008) Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(25), 8795-800.
- Laufs, P., Peaucelle, A., Morin, H. and Traas, J. (2004) MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development* 131(17), 4311-22.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75(5), 843-54.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H. and Kim, V.N. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 23(20), 4051-60.
- Lewis, B.P., Burge, C.B. and Bartel, D.P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120(1), 15-20.
- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J. and Chen, X. (2005) Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr Biol* 15(16), 1501-7.
- Lim, L.P., Glasner, M.E., Yekta, S., Burge, C.B. and Bartel, D.P. (2003) Vertebrate microRNA genes. *Science* 299(5612), 1540.
- Liu, P.P., Montgomery, T.A., Fahlgren, N., Kasschau, K.D., Nonogaki, H. and Carrington, J.C. (2007) Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *Plant J* 52(1), 133-46.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D. and Carrington, J.C. (2002) Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 297(5589), 2053-6.

- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E. and Kutay, U. (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303(5654), 95-8.
- Maher, C., Stein, L. and Ware, D. (2006) Evolution of Arabidopsis microRNA families through duplication events. *Genome Res* 16(4), 510-9.
- Maia, I.G., Seron, K., Haenni, A.L. and Bernardi, F. (1996) Gene expression from viral RNA genomes. *Plant Mol Biol* 32(1-2), 367-91.
- Mallory, A.C., Bartel, D.P. and Bartel, B. (2005) MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* 17(5), 1360-75.
- Mallory, A.C., Dugas, D.V., Bartel, D.P. and Bartel, B. (2004) MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr Biol* 14(12), 1035-46.
- Matthews, R.E.F. (1991) *Plant virology*. Third ed. edn. San Diego, California: Academic Press.
- Mayer, K.F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G. and Laux, T. (1998) Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* 95(6), 805-15.
- McConnell, J.R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J. and Barton, M.K. (2001) Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. *Nature* 411(6838), 709-13.
- Meraï, Z., Kerenyi, Z., Kertesz, S., Magna, M., Lakatos, L. and Silhavy, D. (2006) Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* 80(12), 5747-56.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G.J. and Qi, Y. (2008) Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133(1), 116-27.
- Molnar, A., Csorba, T., Lakatos, L., Varallyay, E., Lacomme, C. and Burgyan, J. (2005) Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J Virol* 79(12), 7812-8.
- Montgomery, T.A. and Carrington, J.C. (2008) Splicing and dicing with a SERRATED edge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(25), 8489-90.
- Morel, J.B., Godon, C., Mourrain, P., Beclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F. and Vaucheret, H. (2002) Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* 14(3), 629-39.

- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O. and Jones, J.D. (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312(5772), 436-9.
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C. and Weigel, D. (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425(6955), 257-63.
- Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M. and Vaucheret, H. (1997) Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *Embo J* 16(15), 4738-45.
- Parizotto, E.A., Dunoyer, P., Rahm, N., Himber, C. and Voinnet, O. (2004) In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes Dev* 18(18), 2237-42.
- Park, M.Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H. and Poethig, R.S. (2005) Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(10), 3691-6.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J. and Chen, X. (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. *Curr Biol* 12(17), 1484-95.
- Petersen, M., Nielsen, C.B., Nielsen, K.E., Jensen, G.A., Bondensgaard, K., Singh, S.K., Rajwanshi, V.K., Koshkin, A.A., Dahl, B.M., Wengel, J. and Jacobsen, J.P. (2000) The conformations of locked nucleic acids (LNA). *J Mol Recognit* 13(1), 44-53.
- Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D. and Benfey, P.N. (1999) The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J* 18(1), 111-9.
- Qu, F., Ren, T. and Morris, T.J. (2003) The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J Virol* 77(1), 511-22.
- Ramachandran, V. and Chen, X. (2008) Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science* 321(5895), 1490-2.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403(6772), 901-6.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B. and Bartel, D.P. (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16(13), 1616-26.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B. and Bartel, D.P. (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110(4), 513-20.



- Robinson-Beers, K., Pruitt, R.E. and Gasser, C.S. (1992) Ovule Development in Wild-Type Arabidopsis and Two Female-Sterile Mutants. *Plant Cell* 4(10), 1237-1249.
- Russo, M., Burgyan, J. and Martelli, G.P. (1994) Molecular biology of tombusviridae. *Adv Virus Res* 44, 381-428.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. . (1989 ) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed.. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Scholthof, H.B., Scholthof, K.B., Kikkert, M. and Jackson, A.O. (1995) Tomato bushy stunt virus spread is regulated by two nested genes that function in cell-to-cell movement and host-dependent systemic invasion. *Virology* 213(2), 425-38.
- Schwab, R., Palatnik, J.F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M. and Weigel, D. (2005) Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell* 8(4), 517-27.
- Schwartz, B.W., Yeung, E.C., and Meinke, D.W. (1994) Disruption of morphogenesis and transformation of the suspensor in abnormal suspensor mutants of Arabidopsis. *Development*(120), 3235–3245.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P.D. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115(2), 199-208.
- Shen, B. and Goodman, H.M. (2004) Uridine addition after microRNA-directed cleavage. *Science* 306(5698), 997.
- Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M. and Burgyan, J. (2002) A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *Embo J* 21(12), 3070-80.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J. and Joshua-Tor, L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305(5689), 1434-7.
- Souret, F.F., Kastenmayer, J.P. and Green, P.J. (2004) AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. *Mol Cell* 15(2), 173-83.
- Sunkar, R., Girke, T., Jain, P.K. and Zhu, J.K. (2005) Cloning and characterization of microRNAs from rice. *Plant Cell* 17(5), 1397-411.
- Szittyá, G., Molnar, A., Silhavy, D., Hornyik, C. and Burgyan, J. (2002) Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *Plant Cell* 14(2), 359-72.
- Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P. and Zamore, P.D. (2003) A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 17(1), 49-63.

- Tolstrup, N., Nielsen, P.S., Kolberg, J.G., Frankel, A.M., Vissing, H. and Kauppinen, S. (2003) OligoDesign: Optimal design of LNA (locked nucleic acid) oligonucleotide capture probes for gene expression profiling. *Nucleic Acids Res* 31(13), 3758-62.
- Tzfira, T., Rhee, Y., Chen, M.H., Kunik, T. and Citovsky, V. (2000) Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. *Annu Rev Microbiol* 54, 187-219.
- Ulmasov, T., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J. (1997) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276(5320), 1865-8.
- Ulmasov, T., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J. (1999) Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10), 5844-9.
- Vance, V. and Vaucheret, H. (2001) RNA silencing in plants--defense and counterdefense. *Science* 292(5525), 2277-80.
- Vaucheret, H. (2008) Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci* 13(7), 350-8.
- Vaucheret, H., Mallory, A.C. and Bartel, D.P. (2006) AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Mol Cell* 22(1), 129-36.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crete, P. and Bartel, D.P. (2004) The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev* 18(10), 1187-97.
- Vazquez, F., Gascioli, V., Crete, P. and Vaucheret, H. (2004) The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Curr Biol* 14(4), 346-51.
- Voinnet, O. and Baulcombe, D.C. (1997) Systemic signalling in gene silencing. *Nature* 389(6651), 553.
- Voinnet, O., Lederer, C. and Baulcombe, D.C. (2000) A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103(1), 157-67.
- Voinnet, O., Pinto, Y.M. and Baulcombe, D.C. (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24), 14147-52.
- Wang, J.W., Wang, L.J., Mao, Y.B., Cai, W.J., Xue, H.W. and Chen, X.Y. (2005) Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17(8), 2204-16.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.B. and Lough, T. (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411(6839), 834-42.

- White, J.L. and Kaper, J.M. (1989) A simple method for detection of viral satellite RNAs in small plant tissue samples. *J Virol Methods* 23(2), 83-93.
- Williams, L., Grigg, S.P., Xie, M., Christensen, S. and Fletcher, J.C. (2005) Regulation of Arabidopsis shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes. *Development* 132(16), 3657-68.
- Woodward, A.W. and Bartel, B. (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot (Lond)* 95(5), 707-35.
- Wu, M.F., Tian, Q. and Reed, J.W. (2006) Arabidopsis microRNA167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction. *Development* 133(21), 4211-8.
- Wysocka-Diller, J.W., Helariutta, Y., Fukaki, H., Malamy, J.E. and Benfey, P.N. (2000) Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* 127(3), 595-603.
- Xie, Q., Guo, H.S., Dallman, G., Fang, S., Weissman, A.M. and Chua, N.H. (2002) SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. *Nature* 419(6903), 167-70.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E. and Carrington, J.C. (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2(5), E104.
- Yang, L., Huang, W., Wang, H., Cai, R., Xu, Y. and Huang, H. (2006a) Characterizations of a hypomorphic argonaute1 mutant reveal novel AGO1 functions in Arabidopsis lateral organ development. *Plant Mol Biol* 61(1-2), 63-78.
- Yang, L., Liu, Z., Lu, F., Dong, A. and Huang, H. (2006b) SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. *Plant J* 47(6), 841-50.
- Yang, Z., Ebright, Y.W., Yu, B. and Chen, X. (2006c) HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res* 34(2), 667-75.
- Yoo, B.C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y.M., Lough, T.J. and Lucas, W.J. (2004) A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* 16(8), 1979-2000.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R. and Chen, X. (2005) Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307(5711), 932-5.

- Zhang, X., Yuan, Y.R., Pei, Y., Lin, S.S., Tuschl, T., Patel, D.J. and Chua, N.H. (2006)  
Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1  
cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* 20(23), 3255-68.

### **Köszönetnyilvánítás**

Ph.D. tanulmányaimat az Eötvös Loránd Tudományegyetemen, a Prof. Orosz László által vezetett doktori iskolában végeztem.

A dolgozatban bemutatott kísérleteket a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Növény Virologiai Csoportjában készítettem el. Köszönettel tartozom csoportvezetőmnek Dr. Burgyán Józsefnek és témavezetőmnek, Dr. Havelda Zoltánnak, akik elméleti és gyakorlati tanácsaikkal segítették munkámat. Köszönöm Dr. Nagy Ferenc és Dr. Kiss György Botond főigazgató uraknak, hogy lehetőséget biztosítottak munkám elvégzéséhez.

Köszönet illeti a Növény Virologiai csoport minden tagját a munkám során nyújtott segítségükért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak a munkámat végigkísérő biztatást és támogatást.

## Összefoglaló

Az eukariótákból leírt nem kódoló kis RNS-ek egyik nagy csoportját a genomban kódolt MIR génekről keletkező miRNS-ek alkotják. A miRNS-eknek rendkívül fontos szerepük van a különböző fejlődésszabályozási folyamatokban, a fehérje-kódoló gének kb. 30%-át szabályozzák.

Kis méretük miatt a miRNS-ek kimutatására az általánosan használt DNS oligókkal nehézséget okozott, ezért munkánk során először kidolgoztunk egy hatékony és specifikus miRNS kimutatási módszert. Ehhez ún. locked nucleic acid (LNA)- módosított oligonukleotid próbákat használtunk fel, melyekkel a northern hibridizálás érzékenysége 10-szeresére növekedett a hasonló körülmények között hibridizált DNS oligókhoz képest. Kimutattuk azt is, hogy a kapott jelek specifikusak és az LNA oligók felhasználása lehetővé teszi akár egy mismatch kimutatását is, vagyis az egy miRNS családba tartozó miRNS-ek elkülönítését.

A northern blothoz hasonlóan érzékenynek és specifikusnak bizonyultak az LNA oligók az *in situ* hibridizációs vizsgálatok során is. Az LNA oligók felhasználásával elkezdtuk egy *in situ* miRNS adatbázis felállítását.

A miRNS-ek által történő szabályozási folyamatok vizsgálatához összehasonlítottuk a miR160 és célszekvenciájának expressziós mintázatát, akkumulációt kaptunk, ami alapján úgy tűnik, hogy a miR160 elsősorban a célszekvencia eltávolításán keresztül fejti ki hatását.

Mivel a miRNS és vírus elleni védekezést szolgáló silencing útvonal részben átfed, ezért vizsgáltuk a különböző vírusfertőzések során tapasztalható miRNS-szint változásokat. A különböző vírusokkal fertőzött *N. benthamiana* és *A. thaliana* RNS kivonatok és fixált szövetek vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az általunk vizsgált miRNS-ek közül csak a miR168 mennyisége változott meg jelentősen vírusfertőzés hatására. Az *in situ* hibridizációs kísérletek azt mutatták, ez a változás a szövetekben a fertőzött területekre korlátozódik. A fertőzés hatására bekövetkező miR168 expresszió növekedés növénytől és vírustól független, általános reakció. A megnövekedett miR168 szinttel párhuzamosan a fertőzött *N. benthamiana* kivonatokban a miR168 célszekvenciája, az Ago1 mRNS mennyisége is megnőtt, az általa kódolt fehérje mennyisége viszont változatlan maradt. Ez feltételezhetően arra utal, hogy a miR168 a célszekvencia hasítása mellett transzlációs gátlással is szabályozza az Ago1-et.

## Summary

MicroRNAs (miRNAs) are an abundant class of small, endogenous non-protein-coding RNAs. They have been shown to control a wide variety of biological functions, including development, hormone and stress responses and feedback mechanisms, and they regulate approximately 30% of protein coding genes.

Reliable detection of miRNAs, because of their short length, is technically very difficult, so first we developed a new sensitive and specific locked nucleic acid (LNA) based technology for northern blot detection of miRNAs. The sensitivity of LNA probes in detecting mature microRNAs by northern blot analysis was increased by at least 10-fold compared to DNA probes, and simultaneously they were highly specific and could discriminate members of the same miRNA family which often differ only by one or two bases.

LNA-modified probes were also highly effective in detecting plant miRNAs by *in situ* hybridization. Using the developed *in situ* hybridization technology, we investigated the spatial and temporal miRNA accumulation in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis thaliana* and started to establish an *in situ* miRNA library.

To investigate the molecular mechanism of miRNA mediated processes, we compared the accumulation of miR160 and one of its target mRNAs. These *in situ* hybridization experiments showed largely complementary expression patterns, indicating that miR160 acts by eliminating the target gene.

Finally, because virus infections interfere with miRNA pathways we examined the alteration of miRNA accumulation during virus infection. miR168 accumulated to a higher level in virus infected than in the uninfected *N. benthamiana* and *A. thaliana* extracts. The northern blot analysis results indicated that the increased miR168 expression during virus infection is a general, plant- and virus-independent response. *In situ* hybridization of *N. benthamiana* and *A. thaliana* tissues showed that the increased level of miR168 colocalised with the virus infected part of tissues. In parallel with the increased miR168 expression in virus infected plant extracts, we found increased level of Ago1 mRNA, which is the target of miR168. In contrast the AGO1 protein level remained unchanged, suggesting that beside the cleavage of the target mRNA, miR168 may act on translational repression also.